

Untersuchungen zum extrazellulären und intrazellulären Sauerstofftransfer

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Oliver Schweder
geboren am 18.02.1975 in Hannover

2006

Referent: Prof. Dr. T. Scheper
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. B. Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Tag der Promotion: 26.06.2006

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Juni 2006

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2001 bis März 2006 am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm gilt mein Dank für die fachliche Unterstützung und die mir angebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die das Gelingen der Arbeit ermöglichten aber auch für die zahlreichen interessanten Aufgaben um die Promotion herum, die mir zahlreiche Einblicke und Entwicklungsmöglichkeiten geboten haben.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferates, die Unterstützung bei der Modellierung und das stets wache Auge in der Funktion als Sicherheitsbeauftragter.

Für die Förderung des Projektes „Kultivierung von *Acremonium chrysogenum*“ danke der ANBICS AG, insbesondere Herrn Dr. W. Minas und Frau Dr. C. Fuchs als Repräsentanten und Schnittstelle.

Ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung beim zweiten Projekt „optische Sauerstoffmessung“ gilt Herrn Dr. O.W. Reif, Herrn Dr.R. Baumfalk, Herrn Dr. W. Kuhlmann und Herrn Dr. B.U. Wilhelm von der Sartorius AG sowie Herrn Dr. G. John von der Firma PreSens.

Herrn Prof.Dr. A. Brakhage und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der modifizierten Stämme von *Acremonium chrysogenum*.

Herrn H.R. Keitel von der Sartorius AG möchte ich für die technische Unterstützung rund um Bioreaktoren und viel heitere Stunden am Telefon sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. em. Karl Schügerl danke ich für zahlreiche informative, interessante und auch heitere Gespräche rund um die Biotechnologie und für die Hilfe bei meinen „Pilzproblemen“.

Wie in fast jeder Arbeit, die dieses Institut verlässt, darf Martina Weiss an dieser Stelle auf keinen Fall unerwähnt bleiben. Vielen Dank für die Unterstützung bei der HPLC-Analytik.

Der Werkstatt-Mannschaft danke ich für die viele geleistete Arbeit, einer Menge guter Ideen und zahlreiche konstruktive Gespräche.

Herrn Dr. Frank Stahl und Martin Pähler gilt mein Dank für die Hilfe bei der PCR (und dafür, dass Sie unermüdlich versucht haben, mich für die Größenordnung des μL zu gewinnen)

Frau Dr. Cornelia Kasper danke ich für zahlreiche Diskussionen.

Bei Ulrike Schimroszyk bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung eines Schwerpunktpraktikums.

Dana Schiefelbein gilt mein Dank für die Zusammenarbeit in den Kultivierungen der Hybridomazellen.

Guido Rudolph möchte ich für seine Hilfe bei der Insitu-Mikroskopie danken.

Arne Burzlaff und Kirstin Suck danke ich für die Hilfe in Sachen \LaTeX

Dank gilt auch Mike Bühring; für die Kooperation bei der Kultivierung des *Corynebacterium glutamicum* einerseits, andererseits aber auch für fachliche und weniger fachliche Diskussionen (Könnteklappenkönteklappen).

Allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie der Universität Hannover, die ich noch nicht erwähnt habe und die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet haben, danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfe bei meinen Aufgaben.

Karin und Rainer möchte ich für viele Herausforderungen und Erfolge außerhalb der Biotechnologie danken.

Bei allen Rodes bedanke ich mich für die Unterstützung und viele schöne Momente.

Christine, Dir möchte ich neben deinen Bemühungen um die Modellierung und für das Korrekturlesen in erster Linie für Deine Liebe und Dein Verständnis danken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Erika und Engelbert sowie meinen Geschwistern Katharina und Alexander noch einen besonderen Dank aussprechen. Ohne Euch wäre mein Studium mit anschließender Promotion aus vielerlei Gründen nicht möglich gewesen.

Inhalt

Abstract	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung und Aufgabenstellung	5
2 Theorie	7
2.1 Sauerstofftransfer	7
2.1.1 Bilanzierung des Sauerstoffeintrags	8
2.1.2 Phasenübergang des Sauerstoffs	11
2.2 Hämoglobin	12
2.3 Cephalosporin	14
3 Methoden	17
3.1 Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i>	17
3.1.1 Kultivierungen im Schüttelkolben	17
3.1.2 Kultivierungen im Bioreaktor	18
3.1.3 Aufbau des Reaktorsystems für die Produktionskultur	20
3.1.3.1 Aufbau des Biostat C	20
3.1.3.2 Aufbau des Biostat UD im Rührkesselbetrieb	21
3.1.3.3 Aufbau des Biostat UD im Umwurbetrieb	22
3.1.3.4 Aufbau des Reaktorbehälters im Umwurbetrieb	24
3.1.4 Messung des intrazellulären pH-Wertes	24
3.2 Messung des Sauerstoffeintrags	25
4 Ergebnisse der Sauerstoffmessung	28
4.1 Charakterisierung von Messsystem und Gefäßen	28
4.1.1 Vergleich von Optode und Clark-Elektrode	28
4.1.1.1 Messung der Ansprechzeit	29
4.1.1.2 Untersuchung zum Einfluss der Messmethode	30
4.1.1.3 Untersuchung zur Genauigkeit und Präzision der Messmethoden	32
4.1.1.4 Fazit	35
4.1.2 Charakterisierung von Schüttelkolben	37
4.1.2.1 Variation des Kolbenverschlusses	37
4.1.2.2 Variation des Kolbennennvolumens	40
4.1.2.2.1 Untersuchungen mit einer Amplitude von 2,5 cm . .	41
4.1.2.2.2 Untersuchungen mit einer Amplitude von 5 cm . . .	45

4.1.2.3	Variation der Schikanenzahl	48
4.1.2.3.1	Untersuchungen mit einer Amplitude von 2,5 cm . .	49
4.1.2.3.2	Untersuchungen mit einer Amplitude von 5 cm . . .	51
4.1.2.4	Fazit	54
4.1.2.5	Auswahl des Kolbenmaterials	56
4.1.2.6	Positionierung des Farbstoffpads	57
4.1.3	Bestimmung des Sauerstoffeintrags anhand der numerischen Lösung eines Gleichungssystems	59
4.1.4	Charakterisierung anderer Kulturgefäße	64
4.1.4.1	Charakterisierung von Prototypen einer neuen Spinnergeneration für die Kultivierung von Säugerzellen	64
4.1.4.2	Charakterisierung eines Bioreaktors am Beispiel des Biostat B	67
4.2	Verwendung des optischen Systems bei der Kultivierung von Mikroorganismen	69
4.2.1	Kultivierungen im Schüttelkolben	69
4.2.1.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> im Schüttelkolben	69
4.2.1.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im Schüttelkolben	71
4.2.1.3	Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i> im Schüttelkolben	72
4.2.1.4	Kultivierung von <i>Euglena gracilis</i> im Schüttelkolben	76
4.2.2	Kultivierung von BA-D5 Hybridomzellen im Superspinner	77
4.2.3	Kultivierungen im Bioreaktor	79
4.2.3.1	Kultivierungen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> im Bioreaktor als Repeated-Batch-Kultur	79
4.2.3.2	Kultivierungen des <i>Corynebacterium glutamicum</i> im Bioreaktor	80
4.2.3.3	Kultivierungen von <i>Acremonium chrysogenum</i> im Bioreaktor	82
4.2.3.4	Bestimmung von charakteristischen Unterschieden zwischen den Sonden anhand der Kultivierungen von <i>Escherichia coli</i> , <i>Acremonium chrysogenum</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> im Bioreaktor	83
4.3	Zusammenfassung und Ausblick der Sauerstoffmessungen	84
5	Ergebnisse der Kultivierungen von <i>Acremonium chrysogenum</i>	86
5.1	Vorkulturen im Bioreaktor	86
5.2	Kultivierung des Basisstammes ohne das Genkonstrukt für die Produktion des <i>Vitreoscilla</i> -Hämoglobins	91
5.3	Kultivierung des modifizierten Stammes von <i>Acremonium chrysogenum</i> im Biostat C Standardrührkesselreaktor	95

5.4	Kultivierung des modifizierten Stammes von <i>Acremonium chrysogenum</i> im Umwurfreaktor	99
5.5	Beobachtung einer Kultivierung unter Verwendung eines Insitu-Mikroskops	105
5.6	Zusammenfassung und Ausblick der Kultivierungen von <i>Acremonium chrysogenum</i>	107
A	Anhang	110
A.1	Methoden	110
A.1.1	Potentiometrische pH-Wert-Messung (Online)	110
A.1.2	Amperometrische Gelöstsauerstoffmessung (Online)	110
A.1.3	Analytik der Abluftparameter Sauerstoff und Kohlendioxid	110
A.1.4	Insitu-Mikroskopie	111
A.1.5	2D-Fluoreszenzspektroskopie	112
A.1.6	Biomassebestimmung und Vorbereitung des Kulturüberstandes für die weitere Analytik	113
A.1.7	High Performance Liquid Chromatographie	113
A.1.8	Ammonium	114
A.1.9	Glucose	115
A.1.10	Optische Dichte	115
A.1.11	Intrazellulärer pH-Wert	115
A.1.12	Sterilisation	116
A.1.13	PCR	116
	A.1.13.1 RNA Isolierung mit heißer Phenollösung	116
	A.1.13.2 DNase I Verdau	117
	A.1.13.3 cDNA-Synthese	117
	A.1.13.4 Agarosegel	118
A.2	Medien	118
A.3	Puffer und Lösungen	124
A.4	Kolben	127
A.5	Geräteliste	127
A.6	Abkürzungsverzeichnis	129

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schritte beim Sauerstoffübergang in den Kolben	7
2.2	Struktur des VHb-Dimers	13
2.3	Struktur des CPC	14
2.4	Schema der CPC-Synthese	15
3.1	Schema der Reaktorkultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i>	18
3.2	Foto des Reaktorsystems und der Rushton-Turbinen	21
3.3	Darstellung des Produktionsreaktors	22
3.4	Abbildung des Umwurfsystems	24
3.5	Abbildung des Spritzensystems	26
3.6	Abbildung des Messsystems Oxy 4 mit Adaptern	27
4.1	Ansprechzeit mit der Sulfitmethode bei 25 °C	29
4.2	Ansprechzeit mit der Sulfitmethode bei 30 °C und 40 °C	30
4.3	Ansprechzeit mit der Stickstoffmethode bei 25 °C	31
4.4	Ansprechzeit mit der Stickstoffmethode bei 30 °C und 40 °C	31
4.5	Ansprechzeit mit der Stickstoffmethode mit Wiederholung bei 1000 rpm	33
4.6	Ansprechzeit mit der Stickstoffmethode mit Wiederholung bei 500 und 250 rpm	33
4.7	Ansprechzeit mit der Stickstoffmethode mit Wiederholung bei 50 rpm	34
4.8	Verwendete Kolbenverschlüsse	37
4.9	Messreihe der verwendete Kolbenverschlüsse	38
4.10	$k_L a$ -Wert und t_{90} -Zeit der Kolbenverschlüsse	39
4.11	Integrale des Sauerstoffgehalts der Kolbenverschlüsse.	40
4.12	Zeitverlauf silcap 120 rpm, 100 mL Füllvolumen	42
4.13	$k_L a$ -Werte aus der Versuchsreihe Volumenkolben mit 2,5 cm Schüttelhub	43
4.14	Integralsummen der Messreihe Volumenkolben mit kleinem Schüttelhub	44
4.15	Vergleichsexperiment Volumenkolben mit Alu- und Silikonkappe	45
4.16	$k_L a$ -Werte aus der Versuchsreihe Volumenkolben mit 5 cm Schüttelhub.	47
4.17	Quotienten der $k_L a$ -Werte aus den Experimenten mit 5 cm und 2,5 cm der Versuchsreihe Volumenkolben	47
4.18	Abbildung der Kolben mit Schikanen	48
4.19	Abbildung der Messdaten bei 120 rpm und 100 mL Füllvolumen	49
4.20	$k_L a$ -Werte der Messreihe Schikanekolben mit 2,5 cm Schüttelhub	50
4.21	$k_L a$ -Werte bei 100 mL Füllvolumen	51
4.22	$k_L a$ -Werte der Schikanekolben bei großem Schüttelhub	52
4.23	Quotient der $k_L a$ -Werte großer:kleiner Hub	53
4.24	$k_L a$ -Werte bei 5 cm Hub und 100 mL Füllvolumen in Schikanekolben	53

4.25 Vergleich der k_La -Werte von Kolben mit unterschiedlichem Volume und unterschiedlicher Schikanenanzahl	56
4.26 Messung mit Freilegung des mittleren Pads	58
4.27 Darstellung von Mess- und Simulationsdaten	61
4.28 Auftragung von Simulations- und Messdaten gegeneinander	63
4.29 Darstellung des Einflusses der Diffusion	64
4.30 Abbildung des alten und des Rührkerns für das Superspinner-System	65
4.31 Darstellung des Einflusses vom Füllvolumen auf den k_La -Wert	66
4.32 k_La -Werte des Biostat B	68
4.33 Sauerstoffdaten der Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> im Schüttelkolben	70
4.34 Sauerstoffdaten der Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im Schüttelkolben . . .	71
4.35 Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i> in Kolben mit unterschiedlicher Schikanenanzahl	73
4.36 Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i> in Kolben unterschiedlicher Nennvolumina	75
4.37 Kultivierung von <i>Euglena gracilis</i>	76
4.38 Kultivierung der Hybridomzellen im Superspinner	78
4.39 Repeated-Batch-Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
4.40 Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i> im Bioreaktor	81
4.41 Kultivierung von <i>Acremonium chrysogenum</i> im Bioreaktor	82
4.42 Vergleichende Auftragung von Optoden- und Elektrodendaten	84
5.1 RISP-Daten der ersten Reaktorstufe	87
5.2 Offline-Parameter der ersten Reaktorstufe	88
5.3 RISP-Daten der 2. Reaktorstufe	89
5.4 Foto eines Zellpellets und freier Mycelfäden	89
5.5 BioView-Daten der 2. Vorkulturstufe	90
5.6 Offline-Daten der 2. Reaktorvorkultur	91
5.7 RISP-Daten der Produktionskultur ohne Genkonstrukt	92
5.8 BioView-Daten der Produktionsstufe	93
5.9 Offline-Daten der Produktionsstufe	94
5.10 Darstellung der Online-Daten der Hauptkultur des modifizierten Stammes im Rührkesselreaktor	96
5.11 Fluoreszenzdaten der Kultivierung des genetisch modifizierten Stammes im Biostat C-Reaktor	97
5.12 Offline-Daten der Repeated-Batchkultur	98
5.13 Online-Daten der Kultivierung im Umwurfreaktor	100
5.14 Darstellung der Fluoreszenzdaten aus dem Experiment im Umwurfreaktor . .	101

5.15 Offline-Daten der Kultivierung im Umwurfsystem	102
5.16 Verlauf des intrazellulären pH-Werts	103
5.17 Mikroskopaufnahme von mit BCECF präparierten Zellen in leicht basischer Lösung	104
5.18 Mikroskopaufnahme von mit BCECF präparierten Zellen in saurer Lösung . .	104
5.19 Mikroskopaufnahme von mit BCECF präparierten Zellen ohne Hygromycin .	105
5.20 Insitu-Aufnahmen von <i>Acremonium chrysogenum</i>	106
A.1 Zeichnung und Foto des Insitu-Mikroskops	111
A.2 Schemazeichnung der Messzone des Insitu-Mikroskops	112
A.3 Lebenslauf und Passfoto	137

Tabellenverzeichnis

3.1	Werte der Regelparameter der Kultivierungen von <i>Acremonium chrysogenum</i> , die kontinuierlich erfasst werden.	19
3.2	Werte der Parameter der Kultivierungen von <i>Acremonium chrysogenum</i> , die diskontinuierlich erfasst werden	20
4.1	Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für Sulfit- und Stickstoffmethode	28
4.2	Zusammenfassung der Ansprechzeiten	35
4.3	Überblick über die verwendeten Kolbenverschlüsse.	38
4.4	Quotienten der t_1 -Zeiten von Kolben mit verschiedenen Nennvolumina mit un- terschiedlichen Füllvolumina.	42
4.5	Ergebnisse der Simulation	62
4.6	Durch Diffusion übertragene Stoffmenge	64
4.7	Volumenstrom, Druckabfall und $k_L a$ -Wert der Verschiedenen Superspinners .	65
5.1	Zusammenfassung der Sauerstoffdosierungen in der Produktionskultur des un- modifizierten Stammes	95
5.2	Cephalosporinausbeuten in verschiedenen Kultivierungen	107
A.1	Änderung des Flüssigkeitspegels bei 2,5 cm Schüttelhub	127
A.2	Änderung des Flüssigkeitspegels bei 5 cm Schüttelhub	127
A.3	Gasvolumen der Kolben	127
A.4	Übersicht über die verwendeten Bioreaktoren	127

Abstract

The conversion of oxygen is an elementary part of cell-metabolism. Therefore, the success of many biotechnological processes depends on a sufficient oxygen supply of cells. Due to the much simpler way of access, intracellular oxygen concentration is concluded by extracellular oxygen concentration in the culture brew.

In this thesis two aspects of oxygen transfer are considered. First, the oxygen transfer into the culture brew of a shaking flask is investigated by using a chemical model. For this task, a measurement system is used, which is based on measurement of fluorescence lifetime of an oxygen sensitive dye. It is observed, that oxygen transfer is influenced by several factors. These are determined by varying the experimental setup. Changing shaking frequency and amplitude as well as testing different shaking flasks ensures different gas exchange areas. The k_La -value was not sufficient to evaluate the oxygen transfer into the shaking flask. Especially in experiments, influenced mainly by resistance of diffusion, resulting from the closure of the flask and the distance between the opening of the flask and the surface of the liquid, estimation of oxygen transfer into the flasks by using the sum of the integral of the gradient between t_0 and $t_{(pO_2 = 95 \%)}$ is more suitable. Following aspects were observed:

- The closure of the shaking flask takes an important influence on oxygen transfer. This cannot be described by the k_La -value.
- The air volume in the shaking flask forms a resistance of diffusion which k_La -value does not take into account either. The gain of oxygen transfer by using a bigger shaking flask, which results from the bigger gas exchange surface, can be destroyed by this resistance. An optimal filling volume for each shaking flask setup is established.
- The number of baffles is less important than the geometric appearance. At low speed the deep baffles are more efficient. Whereas in experiments at high speed whereas flat baffles showed higher oxygen entry.

Based on these experiments, a system of equation is established. By using this system, it is possible to describe the oxygen transfer into a shaking flask culture. The model describes the oxygen concentration of an experiment with a 300 mL shaking flask and 100 mL filling volume correctly. Some other simulations with the model give the ground for the assumption that a precise simulation of these experiments is only possible by defining a gradient of oxygen concentration over the air filled space in the shaking flasks.

Furthermore, some other vessels for cell culture are investigated with the help of the chemical model system. In addition, the measurement system is tested in several biological systems. Using bacteria, fungus and mammalian cells conclusive data is obtained.

In the second part of this thesis, several cultivations of the fungus *Acremonium chrysogenum* are presented. All strains are high performance strains for industrial use. Some of the strains were genetically modified which enables *Acremonium chrysogenum* to produce the hemoglobin of the *Vitreoscilla*. This modification should enhance the intracellular oxygen concentration and therefore enlarge the productivity of Cephalosporin C. However in many experiments an increase of Cephalosporin C productivity was not reached. The maximum concentration of the antibiotic was achieved with an unmodified strain. One possible cause for this result might

be the cell structure. By the high number of vacuoles, which are typical for high performance strains, the diffusion of the oxygen saturated *Vitreoscilla*-hemoglobin (VHb) is obstructed. Beyond this, hand over of oxygen from VHb occurs not specifically to the enzyme system, producing Cephalosporin C. To detect the intracellular pH-value of *Acremonium chrysogenum* an experimental setup from mammalian cell culture from Burzlaff [11] was modified and used successfully. The data, gained by these test, are lower than the typical values for the cytoplasmatic pH-value. Based on microscopic examinations it is supposed that the values are influenced by the pH-value of the vacuoles. The development of the vacuolic volume can therefore be estimated by the time course of the pH-value.

Knowledge about the movement of a cell cluster can be procured by the technique of insitu-microscopy. The employed system allows to take film sequences, in which the cell cluster resembled a porous sponge.

Keywords:

Acremonium chrysogenum, *Vitreoscilla*-hemoglobin, oxygen measurement, oxygen transfer, k_La -value

Zusammenfassung

Sauerstoff ist ein elementarer Baustein des Zellstoffwechsels. Der Erfolg vieler biotechnologischer Prozesse hängt daher von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung der Zellen ab. Basierend auf Erfahrungswerten schließt man auf den Zustand der Sauerstoffversorgung im Cytoplasma aus dem Gelöstsauerstoffgehalt des Mediums, da dieser, im Gegensatz zum Sauerstoffgehalt des Cytoplasmas, experimentell einfach zugänglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei Faktoren des Sauerstofftransfers betrachtet. Zunächst wird der Sauerstoffübergang in das Kulturmedium eines Schüttelkolbens anhand eines chemischen Modellsystems untersucht. Eingesetzt wird hierfür ein Messsystem, mit dem der Gelöstsauerstoffgehalt mit Hilfe der Fluoreszenzeigenschaften eines Farbstoffes bestimmt wird. Dabei wird festgestellt, dass der Sauerstoffübergang von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Neben der Modifikation des Sauerstoffeintrags durch die Änderung des Energieeintrags über die Variation von Schüttelfrequenz und Schüttelhub sowie der Gastransferfläche durch den Einsatz von Kolben unterschiedlicher Nennvolumina bzw. Kolben mit Schikanen wird auch der Einfluss des Kolbenverschlusses untersucht. Es wird festgestellt, dass der $k_L a$ -Wert nicht ausreicht, um Einflüsse auf den Sauerstoffeintrag in den Kolben zu quantifizieren, die auf den Diffusionswiderstand durch den Kolbenverschluss und den zu überwindenden Weg zwischen Kolbenöffnung und Flüssigkeitsoberfläche zurückzuführen sind. Als geeignete Vergleichsgröße für die verschiedenen Experimente einer Versuchsreihe wird hier die Integralsumme unter der Messkurve von t_0 bis $t_{(pO_2 = 95\%)}$ gewählt.

Es wird jeweils festgestellt:

- Der Kolbenverschluss nimmt einen wesentlichen Einfluss auf den Sauerstofftransfer. Dieser Einfluss kann nicht mit Hilfe des $k_L a$ -Werts erfasst werden.
- Der Gasraum im Kolben stellt einen Widerstand für den Sauerstofftransfer da, der ebenfalls nicht mit dem $k_L a$ -Wert quantifiziert wird. Die Steigerung des Sauerstofftransfers, die bei der Verwendung eines Kolbens mit größerem Nennvolumen erreicht wird, resultierend aus der größeren Gasaustauschfläche, wird durch diesen Widerstand wieder eliminiert. Es wird angenommen, dass es ein kolbenspezifisches, optimales Füllvolumen gibt.
- Die Anzahl der Schikanen ist von geringerem Einfluss als deren Geometrie. Bei niedriger Drehzahl ist die Wirkung tiefer Schikanen, bei hoher Drehzahl die von flachen Schikanen höher.

Aufbauend auf diesen Messungen wird ein Gleichungssystem entwickelt, mit dessen Hilfe der Sauerstoffeintrag in die Reaktionslösung im Schüttelkolben berechnet werden kann. Der Sauerstoffeintrag in einen 300 mL-Kolben mit 100 mL Füllung kann mit hoher Präzision beschrieben werden. Weitere Simulationen anhand des Gleichungssystems geben Anlass zu der Vermutung, dass der Sauerstoffeintrag in einen Schüttelkolben nur unter Berücksichtigung eines Konzentrationsgradienten des Sauerstoffs über den Gasraum des Kolbens möglich sein wird. Darüber hinaus werden weitere Kulturgefäße mit dem bereits erwähnten chemischen Modell untersucht. Das Messsystem wird weiterhin an verschiedenen biologischen Systemen getestet. Es konnten bei Bakterien, Pilzen und Säugerzellen schlüssige Messdaten erzielt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden mehrere Kultivierungen des Pilzes *Acremonium chrysogenum* präsentiert. Es handelt sich hierbei um industrielle Hochleistungsstämme für die Produktion des Antibiotikums Cephalosporin C, von denen einige genetisch modifiziert wurden. Die modifizierten Stämme enthalten einen Teil des Genoms aus dem *Vitreoscilla*, durch das der Pilz in der Lage ist, das Hämoglobin des *Vitreoscilla* herzustellen. Dieses sollte, als Resultat einer Steigerung der intrazellularen Sauerstoffkonzentration, zu einer Erhöhung der Produktivität führen. Trotz zahlreicher Experimente konnte eine Erhöhung der Cephalosporin C-Konzentration durch die genetische Modifikation nicht bestätigt werden. Als mögliche Ursache wird die Zellstruktur erwogen. Durch die in großer Anzahl vorhandenen Vakuolen, die ein Merkmal vieler Hochleistungsstämme sind, wird der Transport des sauerstoffbeladenen *Vitreoscilla*-Hämoglobins (VHb) behindert. Der Anstieg des intrazellularen Sauerstoffgehalts wird als nicht signifikant eingeschätzt. Daneben kommt es nicht zu einer spezifischen Sauerstoffabgabe des VHb an das Enzymsystem für die Cephalosporin C-Produktion. Um den intrazellularen pH-Wert von *Acremonium chrysogenum* zu bestimmen, wird eine Prozedur aus der Säugerzellkultivierung von Burzlaff [11] modifiziert und erfolgreich angewendet. Die gemessenen Werte liegen unterhalb derer, die typischerweise im Cytoplasma vorkommen. Basierend auf mikroskopischen Aufnahmen wird angenommen, dass der Messwert durch den pH-Wert der Vakuolen, der von dem des Cytoplasmas abweicht, maßgeblich beeinflusst wird. Daher ist anhand des zeitlichen Verlaufs der Messdaten eine Aussage über die Entwicklung des Vakuolenvolumens möglich.

Erkenntnisse über die Bewegung der Zellagglomerate einer Vorkultur werden mit Hilfe der Insitu-Mikroskopie gewonnen. Mit dem verwendeten System ist das Aufzeichnen von Videosequenzen möglich. Aus diesen ist ersichtlich, dass sich Agglomerate von *Acremonium chrysogenum* in etwa verhalten wie ein großporiger Schwamm.

Schlagworte:

Acremonium chrysogenum, *Vitreoscilla*-Hämoglobin, Sauerstoffmessung, Sauerstofftransfer, k_{La} -Wert

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Sauerstoff ist ein entscheidender Faktor für Leben. Für höhere Organismen, Säugetiere und nicht zuletzt auch den Menschen bildet er die Lebensgrundlage. Demgegenüber haben sich in extremen Lebensräumen - wie beispielsweise der Tiefsee - auch Ökosysteme etabliert, die nur aufgrund der Abwesenheit von Sauerstoff existieren. Auch in der Biotechnologie ist der Sauerstoff, der den Mikroorganismen zur Verfügung steht, eine Schlüsselkomponente. Die Bedeutung der Sauerstoffversorgung für den Prozess hängt vom jeweiligen Mikroorganismus und der Zielkomponente ab. Bei der Produktion von Biomasse, beispielsweise in der Hefeproduktion einer Brauerei, kommt es bei Sauerstoffmangel durch unerwünschte Nebenreaktionen zu einer Verringerung der Raum-Zeit-Ausbeute. Bei der Produktion von Alkohol durch die Vergärung von Zucker hingegen wirkt Sauerstoff mindernd auf die Ausbeute, da hierdurch ein höherer Anteil der Kohlenstoffmasse des Zuckers zu Kohlendioxid umgesetzt wird. Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten kann ebenfalls von der Sauerstoffkonzentration im Zellinneren abhängen. Die Produktion von Cephalosporin C durch *Acremonium chrysogenum* wird eingestellt, wenn der Sauerstoffgehalt unter einen kritischen Wert fällt. Durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration ist dieser Prozess jedoch reversibel. Fataler wirkt sich ein falscher Sauerstoffgehalt bei der Kultivierung von obligat aeroben bzw. anaeroben Organismen aus. Verschiedene Säugerzellen zur Produktion von Antikörpern oder ähnlichen Produkten mit hoher Wertschöpfung sterben durch Sauerstoffmangel ab. Ein gegensätzliches Problem tritt beispielsweise bei der Kultivierung von *Clostridium formicoaceticum* zur Produktion von Kalzium-Magnesium-Acetat aus Molke auf, wie Harbeck [20] untersucht hat. Hier wirkt Sauerstoff inhibierend auf das Wachstum des Organismus.

Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration kann daher als ein Schlüssel für den Erfolg vieler Bioprozesse gesehen werden. Die Messung der Sauerstoffkonzentration ist auf vielerlei Wegen möglich. Für die Überwachung von Bioprozessen sind jedoch nasschemische Methoden aufgrund ihres hohen manuellen Aufwands nicht geeignet. Eine etablierte Methode ist die Verwendung einer Clark-Elektrode [3] zur amperometrischen Sauerstoffmessung. Hierbei wird der Strom einer kathodischen Sauerstoffreduktion bestimmt und hieraus auf den Sauerstoffgehalt im Medium geschlossen. Diese Methode ist jedoch mit verschiedenen Nachteilen behaftet. Eine Elektrode ist nur begrenzt miniaturisierbar. Sie beinhaltet elektronische Kontakte, die bei Wasserkontakt fehlerhafte Messwerte erzeugen können. Schwer wiegt auch, dass die Amperometrie ein invasives Messverfahren ist. Diese Nachteile können mit optischen Messverfahren umgangen werden. Ein weiterer Vorteil des optischen Verfahrens ist, dass eine Messung durch jedes transparente und farblose Material erfolgen kann. Hierdurch sind auch Messungen in Schüttelkulturen möglich. Somit wird ein weites Experimentierfeld geöffnet. Schüttelkulturen stellen einen elementaren Bestandteil in den Bereichen der Stamm- und Prozessentwicklung

dar. Gegenüber Kultivierungen im Bioreaktor ist der Aufwand deutlich geringer. Es besteht darüberhinaus die Möglichkeit, die Kultur zu beproben, was bei Kultivierungen in Mikrotiterplatten kaum durchführbar ist. Dennoch gibt es nur wenige aktuelle Untersuchungen zum Sauerstoffeintrag in Schüttelkolben.

Aus diesen Betrachtungen werden folgende Arbeitsbereiche definiert:

1. Testen eines optischen Sauerstoffsensors auf seine Einsatzmöglichkeit für Routinemessungen in Reaktoren und Schüttelkolben.
2. Durch Untersuchungen zum Sauerstoffeintrag in Schüttelkolben soll darauf aufbauend untersucht werden, welche Einflussfaktoren bestehen. Anschließend soll der Ansatz für ein Gleichungssystem aufgestellt werden, das den Sauerstoffeintrag beschreibt.
3. In einer weiteren Versuchsreihe soll anhand von *Acremonium chrysogenum* untersucht werden, ob es bei industriell verwendeten Stämmen möglich ist, den intrazellulären Sauerstofftransport durch die Expression eines integrierten Gens für Hämoglobin aus dem *Vitreocillar*-Bakterium zu optimieren. Als Indikator soll hier die Produktion von Cephalosporin C verwendet werden.

2 Theorie

In diesem Kapitel sollen kurz einige Grundlagen beschrieben werden, die für die gestellten Aufgaben von Bedeutung sind.

2.1 Sauerstofftransfer

In Abhängigkeit vom experimentellen Aufbau wird der Sauerstoffübergang von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Der Sauerstoffübergang in einem Schüttelkolben kann in verschiedene Schritte unterteilt werden, die zu einem Konzentrationsprofil führen. Die einzelnen Schritte

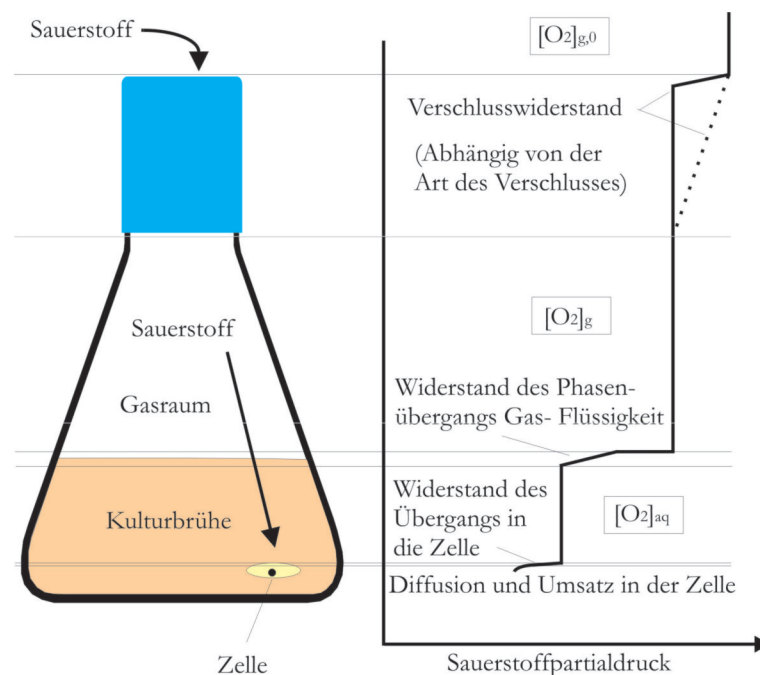


Abb. 2.1: Darstellung der einzelnen Schritte beim Sauerstofftransfer im Schüttelkolben mit Angabe der Sauerstoffkonzentration

sind in Abbildung 2.1 dargestellt, gemeinsam mit Konzentrationsprofil von der Kolbenumgebung bis in die Zelle [28]. Man erkennt drei wesentliche Widerstände für die Diffusion des Sauerstoffs in die Zelle, von denen die Einflüsse des Kolbenverschlusses und der Flüssigkeitsoberfläche experimentell bestimmbar sind. Erreichen kann man eine Variation dieser Parameter durch eine Änderung der Haupteinflussfaktoren für den Sauerstofftransfer [29]:

- Material und Art des Sterilstopfens
- Kolbenform und Kolbenvolumen
- Schüttelfrequenz
- Schütteldurchmesser

- Füllvolumen
- Kolbenmaterial
- physikalische und chemische Eigenschaften des Mediums

Der Diffusionswiderstand, der durch die Gasstrecke, die im Kolben überwunden werden muss, ausgeübt wird, ist in Abbildung 2.1 auf der vorigen Seite nicht angegeben. Der theoretische Verlauf des resultierenden Konzentrationsgradientens sowie die bestimmenden Faktoren konnten nicht ermittelt werden.

Die Änderung des Sauerstoffübergangs in die Zelle und des Sauerstofftransports durch das Cytoplasma ist nur durch Manipulationen des Organismus realisierbar, was nicht immer möglich oder erwünscht ist.

2.1.1 Bilanzierung des Sauerstoffeintrags

Um einen chemischen oder biologischen Prozess mathematisch zu erfassen, verwendet man Bilanzgleichungen. Da im Rahmen dieser Schrift nur isotherme Prozesse betrachtet werden, soll an dieser Stelle nur die Stoffbilanz erläutert werden [22]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\nabla(u c_i) + \nabla(D_i \nabla(c_i)) + \sum_j \nu_{ij} r_j \quad (2.1)$$

Die einzelnen Terme beschreiben:

Akkumulation	$\frac{\partial c_i}{\partial t}$
Erzwungene Konvektion	$\nabla(u c_i)$
Effektive Diffusion	$\nabla(D_i \nabla(c_i))$
Reaktion	$\sum_j \nu_{ij} r_j$

Die Variablen stehen dabei für:

Konzentration der Komponente i	c_i
Zeit	t
Vektorfeld der Geschwindigkeit	u
Diffusionskoeffizient der Komponente i	D_i
Stöchiometrischer Faktor von i in der Reaktion j	ν_{ij}
Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion j	r_j

Übertragen auf die Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit mit Natriumsulfitlösung im Schüttelkolben durchgeführt wurden, sind drei Bilanzgleichungen zu erstellen, die ein Gleichungssystem bilden.

1. Bilanzierung des Sulfitgehalts in der Flüssigkeit $\frac{d[SO_3^{2-}]_{aq}}{dt}$
2. Bilanzierung des Sauerstoffgehalts in der Flüssigkeit $\frac{d[O_2]_{aq}}{dt}$
3. Bilanzierung des Sauerstoffgehalts in der Gasphase des Kolbens $\frac{d[O_2]_{aq}}{dt}$

Angewendet auf die Experimente erhält man die für die Terme der Bilanzgleichung 2.1 im folgenden Abschnitt erläuterten Zusammenhänge.

Der Akkumulationsterm $\frac{\partial c_i}{\partial t}$ beschreibt die Konzentrationsänderung der observierten Komponente.

Die Sulfitkonzentration wird lediglich durch die Reaktion des Sulfits mit dem Sauerstoff in der Flüssigkeit beeinflusst. Die flüssige Phase wird als vollständig durchmischt betrachtet. Daher enthält die Bilanzgleichung für die Sulfitkomponente keinen Konvektions- und Diffusionsterm. Ausgehend von einer Reaktion erster Ordnung bezüglich Sauerstoff und Sulfit erhält man als Bilanzgleichung:

$$\frac{d[SO_3^{2-}]_{aq}}{dt} = -k_R \cdot [O_2]_{aq} \cdot [SO_3^{2-}]_{aq} \quad (2.2)$$

Dabei bedeuten die Parameter:

Reaktionsgeschwindigkeit des Sulfits	$\frac{d[SO_3^{2-}]_{aq}}{dt}$
Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	k_R
Konzentration des Sauerstoffs in der Reaktionslösung	$[O_2]_{aq}$
Konzentration des Sulfits in der Reaktionslösung	$[SO_3^{2-}]_{aq}$

Der Sauerstoffgehalt in der flüssigen Phase wird neben der Reaktion mit Sulfit auch durch den Sauerstoffeintrag über die Phasengrenze aus der Gasphase verändert. Zur Bilanzierung benötigt man daher neben dem Reaktionsterm auch einen Term, der den Sauerstoffübergang beschreibt. Nimmt man an, dass sich zwischen der flüssigen Phase und der Gasphase ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellt [4], ist der Zusammenhang zwischen den Sauerstoffkonzentrationen in der Gasphase und der Flüssigkeit über die Henrykonstante (k_H) zugänglich [53]. Die Differenz der Sauerstoffkonzentration in der Gasphase und der flüssigen Phase ist proportional zur Zunahme der Sauerstoffkonzentration in der flüssigen Phase. Die Proportionalitätskonstante wird als $k_L F$ -Wert bezeichnet. Der Unterschied zwischen dem $k_L F$ -Wert und dem $k_L a$ -Wert, der im Kapitel 2.1.2 beschrieben wird, besteht darin, dass der $k_L a$ -Wert auf das Flüssigkeitsvolumen normiert wird. Der Sauerstoffgradient, der zwischen den beiden Phasen herrscht, stellt die treibende Kraft des Transports da. Als Bilanzgleichung erhält man aus dieser Überlegung:

$$\frac{d[O_2]_{aq}}{dt} = \frac{k_L F}{V_{aq}} \cdot \left(\frac{[O_2]_g}{k_H} - [O_2]_{aq} \right) - \frac{[SO_3^{2-}]_{aq}}{2} \cdot k_R \cdot [O_2]_{aq} \quad (2.3)$$

Geschwindigkeit der Sauerstoffkonzentrationsänderung	$\frac{d[O_2]_{aq}}{dt}$
Sauerstoffübergangskoeffizient	$k_L F - \text{Wert}$
Sauerstoffkonzentration in der Gasphase im Kolben	$[O_2]_{gas}$
Henrykonstante	k_H
Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung	$[O_2]_{aq}$
Sulfitkonzentration in der Reaktionslösung	$[SO_3^{2-}]$
Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	k_R
Volumen der Flüssigkeit	V_{aq}

Für die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase ist die Oxidationsreaktion des Sulfits nicht von direkter Bedeutung. Deshalb ist in der entsprechenden Bilanzgleichung kein Reaktionsterm notwendig. Die Sauerstoffsinke besteht im Übergang aus der Gasphase in die Flüssigphase. Da hierdurch ein Volumenverlust in der Gasphase eintreten würde, kommt es zur Konvektion, bei der Luft mit der Sauerstoffkonzentration $O_{2,G0}$ aus der Umgebung in den Kolben eingetragen wird. Aus diesen beiden Vorgängen resultiert der Term:

$$\frac{k_L F}{V_g} \cdot \left(V_{mol, O_2} \cdot [O_{2,G0}] \left(\frac{[O_{2,G}]}{k_H} - [O_2]_{aq} \right) - \left(\frac{[O_{2,G}]}{k_H} - [O_2]_{aq} \right) \right)$$

Neben dem konvektiven Gasübergang aus der Umgebung in den Gasraum des Kolbens kommt es auch hier zu einem diffusiven Gasaustausch. Dieser kann mit Hilfe der Zeitkonstante des Systems τ beschrieben werden. Mit dem Term $\frac{O_{2,G0} - O_{2,G}}{\tau}$ für die Bilanzgleichung des Sauerstoffgehalts in der Gasphase erhält man nach dem Zusammenfassen:

$$\frac{d[O_2]_g}{dt} = ([O_2]_{g,0} \cdot V_{mol, O_2} - 1) \cdot \frac{k_L F}{V_g} \cdot \left(\frac{[O_2]_g}{k_H} - [O_2]_{aq} \right) + \frac{([O_2]_{g,0} - [O_2]_g)}{\tau} \quad (2.4)$$

Änderungsgeschwindigkeit der Sauerstoffkonz. in der Gasphase	$\frac{d[O_2]_g}{dt}$
Sauerstoffübergangskoeffizient	$k_L F - \text{Wert}$
Sauerstoffkonzentration in der Gasphase im Kolben	$[O_2]_g$
Henrykonstante	k_H
Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung	$[O_2]_{aq}$
Volumen der Flüssigkeit	V_l
Volumen der Gasphase im Kolben	V_g
Zeitkonstante des Systems	τ
Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft	$[O_2]_{g,0}$
Molvolumen des Sauerstoffs	V_{mol, O_2}

Aus dem Gleichungssystem und den Messdaten können mit Hilfe einer Modellanpassung, wie sie in Kapitel 4.1.3 vorgestellt wird, die Parameter $k_L F$, τ und k_R für unterschiedliche experimentelle Aufbauten berechnet werden.

2.1.2 Phasenübergang des Sauerstoffs

Es existieren mehrere Modelle, die den Stoffübergang durch eine Phasengrenze beschreiben [59]. Nicht alle können jedoch die Vorgänge im betrachteten Modellsystem darstellen. So kann beispielsweise die Penetrationstheorie nur Vorgänge bei konstanten Konzentrationen erfassen. Die Zweifilmtheorie basiert auf der Annahme, dass der gesamte Widerstand des Stoffübergangs auf einen laminar schmalen Bereich δ an der Phasengrenze beschränkt ist. An der Phasengrenze besteht ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen in Gas- und Flüssigphase. Das Henrysche Gesetz beschreibt ausgehend von diesem Gleichgewichtszustand, welche Stoffkonzentration in der Flüssigkeit bei einem gegebenen Partialdruck in der Gasphase maximal erreicht wird. Innerhalb des Films resultiert der gesamte Stofftransport aus stationärer Diffusion, ohne Quellen und Senken. Außerhalb des Films herrscht aufgrund von Vermischung jeweils eine konstante Stoffkonzentration.

Das erste Postulat der Zweifilmtheorie stellt einen Zusammenhang zwischen der Filmdicke δ und dem Diffusionskoeffizienten her. Der Quotient aus diesen beiden Größen ist die Stoffübergangszahl k_i . Man formuliert für die jeweilige Phase:

$$k_i \equiv \frac{D_i}{\delta_i} \quad (2.5)$$

Mit Hilfe des Stoffübergangskoeffizienten formuliert man die Stoffstromdichte j_m als:

$$j_m \equiv \frac{G}{A} = k_G(p - p^*) = k_L(c - c^*) \quad (2.6)$$

Die Variablen haben dabei folgende Bedeutung:

Stoffstromdichte der Komponente m	j_m
Stoffstrom	G
Durchgangsfläche	A
Konzentration	c
Konzentration an der Phasengrenze	c^*
Partialdruck	p
Partialdruck an der Phasengrenze	p^*
Stoffübergangskoeffizienten der Gasphase	k_G
Stoffübergangskoeffizienten der Flüssigphase	k_L

Unter den gegebenen Voraussetzungen ist $k_G \gg k_L$. Ersetzt man daneben noch A gegen a·V kann man Gleichung 2.6 umstellen und erhält den volumenbezogenen flüssigkeitsseitigen Stofftransportkoeffizient k_{La} . [59] :

$$G = k_{La} \cdot \Delta c \quad (2.7)$$

Der k_{La} -Wert wird im Kapitel 4.1.2 verwendet, um den Sauerstoffeintrag in verschiedene Gefäße zu beschreiben. Durch die Normierung auf das Flüssigkeitsvolumen unterscheidet sich der k_{La} -Wert vom $k_L F$ -Wert, der für das Modell in Kapitel 4.1.3 verwendet wird.

Eine Verfeinerung der Filmtheorie ist die Grenzschichttheorie. Gegenüber der Filmtheorie können sich hier innerhalb der Grenzschicht Konzentration und Geschwindigkeit des Stofftransports in alle Koordinatenrichtungen ändern. Für die Betrachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit getätigt werden, soll diese Theorie nicht angewendet werden, da hierfür genaue Kenntnisse über die Strömungsverhältnisse notwendig sind.

2.2 Hämoglobin

Wie bereits im letzten Kapitel erwähnt, besteht auch die Möglichkeit, den intrazellularen Sauerstofftransport durch eine Manipulation des kultivierten Organismus zu beeinflussen. Ein Beispiel für Proteine, die die Sauerstoffkonzentration in den Zellen beeinflussen können, ist die Gruppe der Hämoglobine. Neben höheren Organismen, bei denen das Hämoglobin Bestandteil der Erythrozyten ist, können auch verschiedene Mikroorganismen bestimmte Hämoglobine bilden [50] [13] [42]. Die mikrobiellen Hämoglobine unterscheiden sich in ihrer Struktur von den Hämoglobinen der höheren Organismen. Man unterscheidet:

- verkürzte Hämoglobine
- kleine Hämoglobine
- Flavo-Hämoglobine

Das obligat aerobe *Vitreocillar*-Bakterium bildet ein Hämoglobin, das aus zwei Globinuntereinheiten mit je 146 Aminosäuren sowie je einer Häm-Gruppe besteht [51] und zur Gruppe der kleinen Hämoglobine zählt. Die Struktur des Globingerüsts entspricht in weiten Teilen der des typischen Globins. Lediglich die Peptidverbindung zwischen den Helices C und E sowie die Reste E 7 bis E 10 zeigen eine abweichende Anordnung, was sich auf die Form der Häm-Tasche und den Vorgang der Ligandenassimilation auswirkt. Hierfür sind Veränderungen in der Konformation notwendig [48].

Abhängig von seiner Konzentration kann es in die beiden Untereinheiten dissoziieren. Während von der monomeren Form des *Vitreoscilla*-Hämoglobins (VHb) bei einer Konzentration

von 50 mg/L 25-30 % vorliegen, besteht es bei einer Konzentration von 10 g/L fast ausschließlich aus der dimeren Form [35]. Die quartäre Struktur des Homodimer unterscheidet sich von der aller anderen Hämoglobine. Sie resultiert aus der Wechselwirkung zwischen den F- und H-Helices der beiden Untereinheiten. Die Struktur des Dimers ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

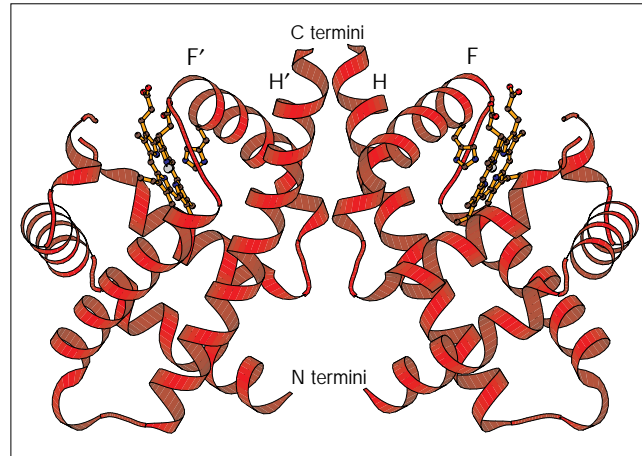


Abb. 2.2: Struktur des Vhb-Dimers nach einer Darstellung aus Tarricone [48]

Man vermutet auf der Basis dieser Struktur eine Interaktion mit der FAD-(NADH)-Reduktase, analog zum Flavohämoglobin von *Alcaligenes eutrophus*. Die genaue Funktion von Vhb innerhalb des Stoffwechsels des *Vitreoscilla*-Bakteriums ist noch nicht aufgeklärt. Man nimmt aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu den Flavo-Hämoglobinen an, dass Vhb neben der Sauerstofffixierung auch bei der Stickstoffmonoxid-Abreicherung in den Zellen von Bedeutung ist [35]. Für den Mechanismus der Sauerstoffübertragung durch Vhb existieren mehrere Modelle:

- Die „Facilitated diffusion hypothesis“ nach Wittenberg [55] besagt, dass ein verstärkter Sauerstofftransport zu den terminalen Oxidasen (Cytochrom bo und bd) stattfindet. Sie wird gestützt durch eine Studie [23], in der festgestellt wurde, dass es bei einem modifizierten *E. coli*-Stamm, der Vhb produziert, zu einer Erhöhung von Atmungsaktivität und ATP-Umsatz kam. Eine weitere Studie, die mit den in die Sauerstoffübertragung involvierten Enzymen befasst ist [33], bestätigt, dass es zu einem verstärkten Sauerstofftransport zur Cytochrom bo Ubiquinon-Oxidase kommt. Auch die kinetischen Werte für die Sauerstoffbindung an Vhb weisen auf diesen Mechanismus hin [32][52]. In einer Studie wurde festgestellt, dass 90 % des Vhb im Cytoplasma lokalisiert sind. Die Nähe zu den cytoplasmischen Membranen deutet auf eine Funktion des Vhb als intrazelluläre Sauerstoffreserve hin. Diese ermöglicht dem obligat aeroben *Vitreoscilla*-Bakterium ein Überleben in Bereichen mit niedriger Sauerstoffkonzentration.

- Als alternativer Wirkmechanismus wird angenommen, dass der [VHb·O₂]-Komplex die Aktivität einiger Schlüsselkomponenten der Zelle beeinflusst. Zu diesen redoxempfindlichen Komponenten zählen Sensoren, Regulatoren und der allosterische Teil von einigen Enzymen, die in die Zellatmung involviert sind. Das intrazelluläre VHb würde auf diese Weise zur Optimierung der Energiespeicherung beitragen [34].

Darüber hinaus kann VHb auch als terminale Oxidase wirken [15]. Die Expression der entsprechenden Gene für die VHb-Produktion ist von der Sauerstoffkonzentration im Medium abhängig. Unter Sauerstofflimitierung kann es zu einer 50-fachen Erhöhung kommen [16][48]. Es gibt verschiedene Untersuchungen, in denen das VHb durch genetische Manipulation in andere Organismen kloniert wurde. Neben dem bereits erwähnten Experiment mit einem modifizierten *E. coli*-Stamm [23], gibt es auch Untersuchungen mit *Acremonium chrysogenum* [14]. Hier konnte eine Erhöhung der Produktion von Cephalosporin C (CPC) durch die Expression von VHb beobachtet werden. Diese Steigerung der CPC-Produktion wird auf eine Erhöhung des intrazellulären Gelöstsauerstoffgehalts durch die genetische Manipulation zurückgeführt, da einige Schritte der Biosynthese des CPC stark von der Sauerstoffkonzentration abhängig sind.

2.3 Cephalosporin

Seit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Flemming im Jahr 1928 sind eine große Anzahl von antibiotisch wirkenden Substanzen isoliert worden. Eine wichtige Gruppe der Antibiotika sind die Cephalosporine. Die Struktur der pharmakologisch wirksamen Gruppe wurde erstmals anhand von Cephalosporin C (CPC) untersucht. Dessen Struktur wurde von Newton und Abraham anhand des Natriumsalzes des CPC ermittelt [1]. Die Struktur des

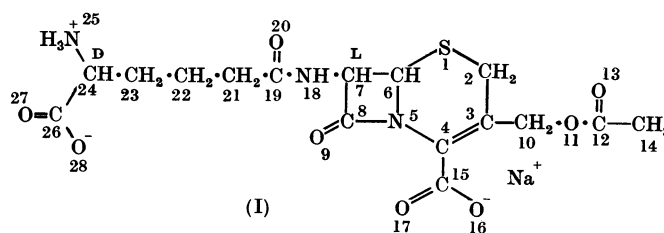


Abb. 2.3: Abbildung der Struktur des Cephalosporin C aus der Arbeit von Abraham und Newton [1]

CPC, wie sie Abraham und Newton in ihrer Arbeit dargestellt haben, zeigt Abbildung 2.3. Von *Cephalosporium acremonium* - erstmals von Brotzu [10] isoliert - wird CPC synthetisiert. Dieser Organismus, der später in *Acremonium chrysogenum* umbenannt wurde, wird - in genetisch modifizierter Form - bis heute für die Produktion von CPC im industriellen

Maßstab verwendet. Das Zielmolekül in der Wirkstoffproduktion ist heute nicht mehr das CPC. Dieses zeigt eine relativ geringe pharmakologische Wirkung. Statt dessen werden halbsynthetische Antibiotika eingesetzt. Hierfür wird das CPC aus der Kulturbrühe isoliert und zu 7-Amino-Cephalosporansäure (7-ACA) umgesetzt. Diese wird dann chemisch oder enzymatisch weiterverarbeitet. Durch Pharmaka, die aus diesen Substanzen hergestellt werden, versucht man, pathogene Organismen zu bekämpfen, die gegen das CPC resistent sind. Derzeit sind etwa 50 verschiedene Cephalosporine kommerziell erhältlich.

Die Biosynthese des CPC ist ein aus sechs Schritten bestehender Prozess, der durch verschiedene Enzyme katalysiert wird. In Abbildung 2.4 sind die Reaktionsschritte der Biosynthese

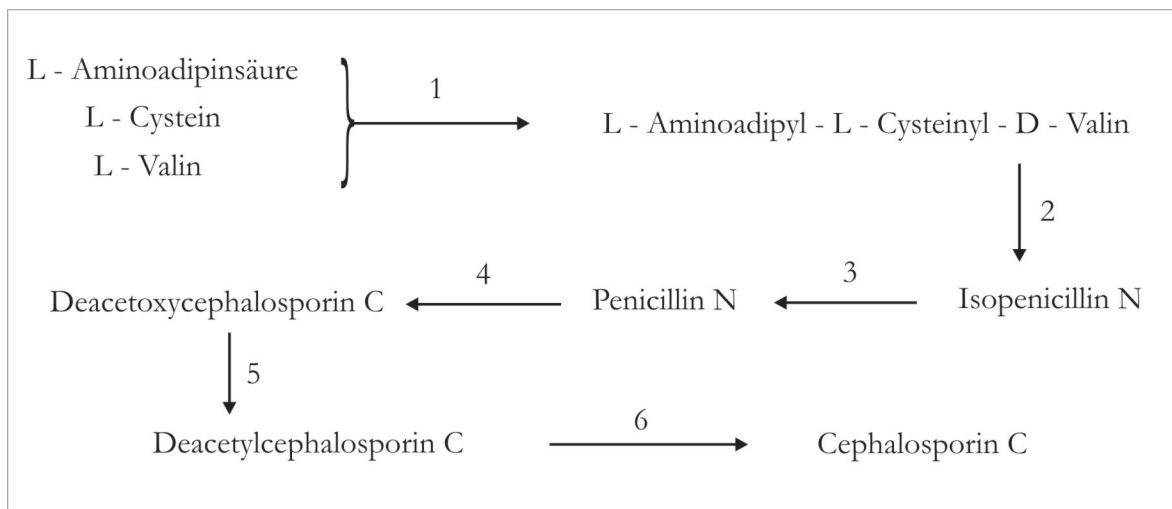


Abb. 2.4: Schema der Biosynthese des Cephalosporin C wie sie von Martin beschrieben wird [31]

des CPC dargestellt. Die erste Reaktion, die nichtribosomale Peptidsynthese des L-Aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valins (ACV) aus den Aminosäuren, die durch die L-Aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valin-Synthetase katalysiert wird, ist zuerst von Martin *et.al.* als ein Engpass der Biosynthese erkannt worden [7][31]. Da diese Reaktion durch Phosphat und Ammonium sowie durch Intermediate der Glycolyse und Glucose inhibiert wird [57][58], resultiert die Notwendigkeit der Fedbatch-Kultivierung für die industrielle CPC-Produktion. Der zweite Schritt zur CPC-Biosynthese ist die Cyclisierung des ACV zum Isopenicillin N. Diese Reaktion ist eine enzymatische Oxidation durch Isopenicillin-N-Synthetase. Bezüglich der Sauerstoffkonzentration handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung, wenn die Sauerstoffkonzentration zwischen 0,07 mM/L und 0,18 mM/L liegt [5]. Somit liegt hier ein möglicher Ansatz für die Steigerung der Synthesegeschwindigkeit durch eine Erhöhung der für den Stoffwechsel zur Verfügung stehenden Sauerstoffkonzentration mittels VHB. Im dritten Schritt kommt es durch Einwirken von Isopenicillin-N-Epimerase zur Umlagerung zum Penicillin N (Pen N). Es folgt die Ringerweiterung zum Deacetoxycephalosporin C mit anschließender Hydroxylierung zum

Deacetylcephalosporin C durch das Enzym Deacetoxycephalosporin C-Synthetase und -Hydrolase. Die These, dass es sich hierbei um ein bifunktionales Enzym handelt, geht zurück auf Scheidegger [39]. Er postulierte dieses, da er nicht in der Lage war, das Intermediat Deacetoxycephalosporin C zu isolieren. Bei der Reaktion wird Sauerstoff umgesetzt. Nach Lukas [27] ist diese Reaktion stärker von der Sauerstoffkonzentration abhängig als die Cyclisierung des ACV zum Isopenicillin N. Kommt es in der Kultur zum Sauerstoffmangel, resultiert eine Akkumulation von Pen N. Auch in diesem Reaktionsschritt kann VHb zur Erhöhung der Ausbeute durch eine Optimierung der Sauerstoffübertragung führen. Die Bestimmung von Pen N wird im Rahmen dieser Schrift nicht als Indikator für die Sauerstoffversorgung herangezogen. Es steht für die HPLC-Analytik kein stabiler Standard zur Verfügung. Es kann daher nur sicher detektiert werden, nach welcher Verweilzeit der Peak des Pen N im Chromatogramm erscheint, eine genaue Quantifizierung ist aufgrund der Instabilität des Pen N in der Standardlösung nicht möglich.

Im letzten Schritt der Biosynthese des CPC kommt es zur Acylierung des Deacetylcephalosporin C durch das Enzym Deacetylcephalosporin C-Acetyltransferase.

3 Methoden

3.1 Kultivierung von *Acremonium chrysogenum*

Die Stammhaltung aller verwendeten Stämme kann nicht, wie bei den meisten Mikroorganismen üblich, mittels Gefrierkulturen erfolgen, da es durch das Einfrieren der Kultur zu einer erheblichen Abnahme der Produktivität kommt. Vorversuche mit einer Stammhaltung der sporelierten Form des Organismus erbrachten ebenfalls ein negatives Ergebnis. Daher erfolgt die Stammhaltung auf Agar-Schrägen. Die Originalkulturen werden vom Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Brakhage, bezogen. Hier werden die Kulturen auf Agarplatten aus m190-Medium kultiviert und gelagert. Am Institut für Technische Chemie werden diese für die Kultivierungen auf CFC 1-Medium (siehe Anhang A.2) umgesetzt. Es werden aus einer Originalkultur maximal 2 Generationen Stammkulturen erstellt. Danach wird wieder eine neue Originalkultur verwendet. Für die Erstellung einer Stammkultur werden 300 μL einer über 3 Tagen in CFC 2-Medium (siehe Anhang A.2) inkubierten Kultur auf einer Agarschräge, die aus ca. 30 mL CFC 1-Medium (siehe Anhang A.2) in einem Reagenzglas mit 28 mm Durchmesser besteht, mit einer Platinöse ausgestrichen und 12 Tage bei 28 °C inkubiert. Diese Kultur ist ca. 3 Monate lagerfähig und wird bei 4 °C aufbewahrt. Alle Kultivierungsexperimente werden aus einer Stammkultur auf CFC 1-Medium beimpft. Die Kultivierungen mit verschiedenen Stämmen werden immer nach der gleichen Prozedur durchgeführt, unabhängig ob es sich um einen Stamm mit oder ohne *Vitreoscilla*-Genom handelt. Um die Vitalität und die Produktivität der Stämme zu prüfen, wird vor einer Kultivierung eine Schüttelkolbenkultivierung (Slant-Evaluation) in einem speziellen Medium durchgeführt.

3.1.1 Kultivierungen im Schüttelkolben

Für die Kultivierungen, bestehend aus einer Vorkultur und einer Hauptkultur, werden ca. 1 cm² Mycel mit einer Platinimpföse von einer Agarschräge abgenommen. Die Mycelmasse wird in ein Mikroreaktionsgefäß (2 mL Nennvolumen) der Fa. Eppendorf, gefüllt mit 1,5 mL 0,9 %iger Natriumchloridlösung und 12 Glasperlen des Durchmessers 1,2 mm, gegeben und mit einem Vortex-Schüttler für 1 min gerührt, um die Zellagglomerate zu zerkleinern. Die Zellsuspension wird in einen mit 50 mL CFC-2-Medium (s. Anhang A.2) gefüllten Kolben mit 500 mL Nennvolumen überführt und 72 h bei 28 °C und 240 rpm Schüttelgeschwindigkeit im Schüttler Certomat BS 1 der Fa. Sartorius inkubiert. 3 mL dieser Kulturbrühe werden dann in einen 300 mL-Kolben mit 30 mL CFC 3A-Medium (s. Anhang A.2) überführt. Diese Kultur wird 5 Tage bei 25 °C und 300 rpm im Schüttler Certomat BS 1 (Fa. Sartorius) kultiviert. Danach werden 2 mL der Kultur bei 16000 g zentrifugiert und 1 mL des Überstands in 4 mL eiskaltes Methanol gegeben um die Proteine abzutrennen. Der Überstand der Fällung wird

durch einen Filter mit $0,2\ \mu\text{m}$ Porenweite filtriert und mit HPLC auf den Cephalosporin-C-Gehalt untersucht.

3.1.2 Kultivierungen im Bioreaktor

Die Kultivierungen im Bioreaktor sind einem industriellen Produktionsprozess nachempfunden. Daher gehen der Hauptkultur drei Vorkulturen voraus. Abbildung 3.1 gibt den Verlauf

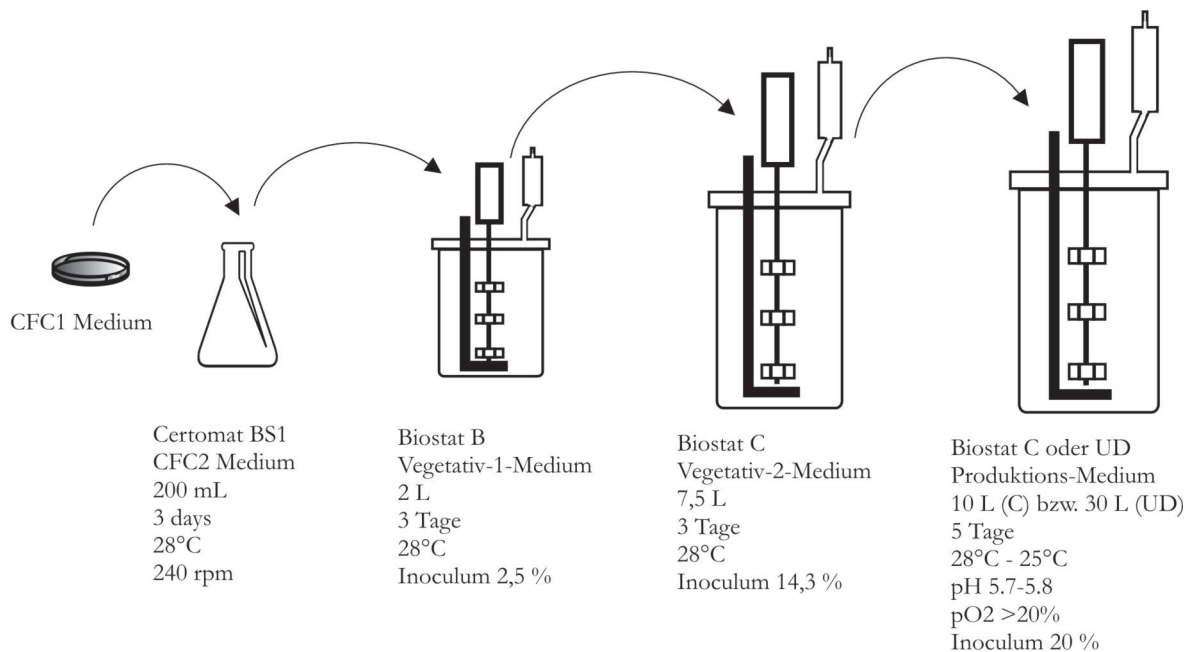


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer kompletten Kultivierung von *Acromonium chrysogenum*, bestehend aus einer Vorkultur im Schüttelkolben, den Reaktorstufen 1 und 2 und der Produktionskultur, dargestellt.

einer kompletten Kultivierung wieder. Für die erste Vorkultur wird ca. $1\ \text{cm}^2$ Mycel mit einer Platinimpföse von einer Agarschräge abgenommen in eine Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die Zellklumpen werden, wie für ein Schüttelkolbenexperiment im vorhergehenden Kapitel beschrieben, aufgearbeitet. Die Zellsuspension wird in einen mit 200 mL CFC 5-Medium (s.Anhang A.2) gefüllten Kolben mit 1000 mL Nennvolumen überführt und 96 h bei $28\ ^\circ\text{C}$ und 240 rpm Schüttelgeschwindigkeit im Schüttler Certomat BS 1 der Fa. Sartorius inkubiert. Aus dieser Kultur wird mittels einer sterilen Spritze ein Reaktor (Biostat B, Fa. Sartorius) mit 0,1 % des Kulturvolumens beimpft. Die Kultur im Vegetativ-1 Medium wird für ca. 72 h bei $28\ ^\circ\text{C}$ unter aeroben Bedingungen kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt erreicht der pH-Wert sein zweites Maximum. Dann wird aus dieser Kultur die zweite Reaktorstufe (Biostat C, Fa. Sartorius) angeimpft, wie in den Daten der Kultivierung beschrieben werden wird. Das Inoculum beträgt 14,3 % des Kulturvolumens der Reaktorstufe II. Als Medium wird Vegetativ-2 Medium verwendet. Diese Kultivierung wird unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie

die vorhergehende Reaktorstufe, bis der pH-Wert das 2. Maximum erreicht. Dies ist hier, aufgrund des größeren Inoculums, nach 36-48 h der Fall. Die Zellsuspension aus dieser Kultur wird verwendet, um die Produktionskultur zu beimpfen. Das Inoculum der Produktionskultur beträgt 20 %. Die Produktionskultur wird für 100 h - 140 h inkubiert.

Während der Kultivierungen im Bioreaktor werden zahlreiche Parameter online überwacht oder aus entnommenen Proben offline ermittelt. Die Probenahme erfolgt über das Bodenablassventil des Bioreaktors. In den Reaktorstufen 1 und 2 werden die Proben mit einem Volumen von jeweils 10 mL in ein Zentrifugegefäß mit 15 mL Nennvolumen (Fa. Sarstedt) abgefüllt und bei 3000 g für 30 min zentrifugiert. Aus dem Sediment wird das Patched-Mycel-Volumen (PMV-Wert) bestimmt. Danach wird das Zellpellet 7 Tage bei 110 °C getrocknet um die Biotrockenmasse zu bestimmen. Aus der oberen Phase des Überstands wird der Sojaölgehalt abgeschätzt. Es soll sich stets eine dünne Ölschicht auf der zentrifugierten Probe befinden. Die untere Flüssigkeitsphase wird weiterer Analytik zugeführt.

Die Proben aus dem Produktionsreaktor (Biostat C oder Biostat UD, Fa. Sartorius) werden in einem Becherglas aufgefangen. 5 mL werden in ein Zentrifugegefäß mit 15 mL Nennvolumen (Fa. Sarstedt) abgefüllt und mit 5 mL vollentsalztem Wasser verdünnt. Dies ist aufgrund der hohen Viskosität der Kulturbrühe notwendig, da ohne diesen Schritt keine Phasentrennung bei der Zentrifugation mehr zu beobachten ist. Die weitere Probenvorbereitung erfolgt wie mit den Proben der Reaktorstufen 1 und 2. Die Parameter, die in Tabelle 3.1 zusammengestellt

	pH-Wert	pO ₂ -Wert	Temperatur	Rührerdrehzahl
Reaktorstufe 1	-	>20%	28 °C	400 rpm - 1200 rpm
Reaktorstufe 2	-	>20%	28 °C	250 rpm - 1500 rpm
Prod.reaktor	5,7 - 5,9	>20%	28 °C - 25 °C	250 rpm - 800 rpm
Messmethode	Potentiometrie	Amperometrie	PT-100-Element	-
Regelung	Amoniak- bzw. Schwefelsäure	Rührer, Begasung, Druck, Sauerstoff	Temperiersystem	pO ₂ -Wertregler

Tab. 3.1: Zusammenfassung der eingestellten Werte für die online gemessenen und geregelten Parameter in den Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum*.

sind, werden automatisch von der Steuereinheit des jeweiligen Bioreaktors erfasst und mit der institutseigenen Software RISP¹-Software aufgezeichnet. Da die kultivierten Zellen neben diesen Wachstumsparametern auch eine stetige Versorgung mit Substraten benötigen, um ihre maximale Produktivität zu erreichen, werden weitere Parameter mit Hilfe der Daten aus den Offline-Messungen eingestellt. Diese sind in Tabelle 3.2 auf der folgenden Seite aufgelistet. Die Korrektur erfolgt mit 70 %igem Glucosesirup und 40 %iger Ammoniumsulfatlösung. Ammoniumeintrag resultiert auch aus der pH-Wert-Regelung. Daneben wurde auch stets Sojaöl

1 Realtime Integrated Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover

	Glucose	Ammonium	Sojaöl
Reaktorstufe 1	-	-	-
Reaktorstufe 2	-	-	-
Prod.reaktor	$0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ - $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$>1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Film
Messmethode	Enzymtest	Reflektometrie	Visuell
Regelung / Feed	kontinuierlich Glucosesirup	diskontinuierlich pH-Kontrolle und Ammoniumsulfatlösung	diskontinuierlich

Tab. 3.2: Zusammenfassung der eingestellten Werte für die offline gemessenen und diskontinuierlich geregelten Parameter in den Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum*.

bereitgehalten. Eine Zugabe war jedoch nicht bei jeder Kultivierung erforderlich.

Die Bestimmung der Parameter erfolgt stets aus zellfreiem Medium, das durch Zentrifugieren aus der Kulturbrühe erstellt wird. Für die HPLC-Analytik werden, wie in der Schüttelkolben-Kultivierungen, die Proteine mit Methanol aus dem Medium entfernt. Ansätze zur Online-Bestimmung der Parameter wurden verworfen, da die steigende Viskosität und Fouling-Prozesse eine Filtration des Mediums mit einem Probenahmemodul unmöglich machen.

Während der Arbeiten hat es sich als notwendig erwiesen, bei der Mediumherstellung Glucose separat von den restlichen Komponenten zu sterilisieren. Es kommt beim Erhitzen der Glucose in Gegenwart dieser Komponenten zu Abbaureaktionen, durch die die Glucosekonzentration um bis zu 50 % abnimmt. Eine Reaktion, die unter den Sterilisationsbedingungen (s. Anhang A.1) auftritt, ist die Maillard-Reaktion [12]. Aus der Maillard-Reaktion gehen zahlreiche Produkte hervor, von denen einigen toxische bzw. mutagene Eigenschaften zugeschrieben werden [18].

3.1.3 Aufbau des Reaktorsystems für die Produktionskultur

Für die Produktionskultur werden verschiedene Reaktorkonstruktionen verwendet. Zunächst wird ein Biostat C System verwendet, da das Biostat UD System zunächst vom Hersteller für die geplanten Arbeiten optimiert wird.

3.1.3.1 Aufbau des Biostat C

Beim Biostat C handelt es sich um ein Standardsystem der Fa. Sartorius, bestehend aus einer Mikro-DCU und einem in situ sterilisierbaren Kessel mit 10 L Arbeitsvolumen. Das Verhältnis zwischen Höhe und Durchmesser beträgt 3:1. Die Zuluft wird über einen eingebauten Mass-Flow-Controller zwischen 0 L/min und 30 L/min geregelt. Der Rührer, bestehend aus drei Rushton-Turbinen (\varnothing 75 mm), wird über einen bürstenfreien Elektromotor auf bis zu 1500 rpm eingestellt. Die Rührerwellenabdichtung ist als doppelte Gleitringdichtung realisiert. Für die Installation von Sonden und Septen stehen sieben 25 mm-Standardports in der Kesselwand und vier 19 mm Deckeldurchgänge zur Verfügung. Während der Kultivierung werden

hierüber eine pH-Elektrode, eine pO_2 -Elektrode, der BioView-Sensor und bei einigen Kultivierungen ein optisches Sauerstoffmesssystem implementiert. Über die Mikro-DCU werden die Rührerdrehzahl, Begasung, der pH-Wert durch Säure- oder Basezugabe, der pO_2 -Wert durch Variation der Begasung und der Rührerdrehzahl gesteuert. Die einzige Modifikation des Reaktorsystems, die gegenüber dem Serienmodell vorgenommen wurde, besteht im Einbau einer Sauerstoffzuleitung vor dem Mass-Flow-Controller des Reaktorsystems, über den mit einem weiteren Mass-Flow-Controller zur Zuluft bis zu 5 L/min reiner Sauerstoff beigemischt werden können. Zur Bestimmung von CO_2 und O_2 in der Abluft wird diese durch ein Messsystem der Firma ABB, bestehend aus einer URAS 14-Einheit und einer Magnos-Einheit, geleitet. Für weitere Kultivierungen wird ein Biostat UD verwendet, der mehrfach umgerüstet wurde. Daher soll auf dieses Reaktorsystem genauer eingegangen werden.

3.1.3.2 Aufbau des Biostat UD im Rührkesselbetrieb

Der Biostat UD wird alternativ als Rührkessel- oder Umwurfreaktor betrieben. Hierbei sind

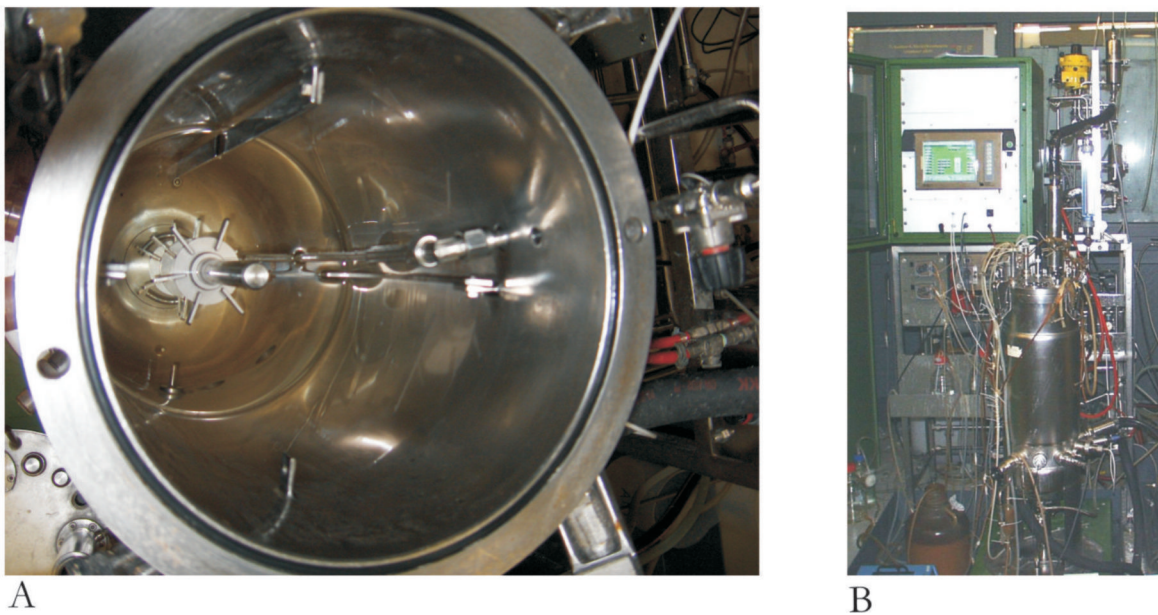


Abb. 3.2: Teil A der Abbildung zeigt die Aufsicht auf den Reaktorbehälter mit den Rushton-Turbinen. Teil B zeigt das Reaktorsystem mit Steuereinheit und Reaktorbehälter.

als Rührer drei Rushton-Turbinen (\varnothing 105 mm) im Abstand von 150 mm übereinander auf der Rührerwelle montiert. Luft wird über einen Begasungsring am Boden des Reaktorbehälters eingebracht. Die Rushton-Turbinen wirken radial und sind aufgrund ihres hohen Dispersionsvermögens gut als begaste Rühroorgane geeignet [40]. Sie sind jedoch für Medien mit einer Viskosität von <10 Pa·s ausgelegt. Da die Viskosität der Kulturbrühe von *Acremonium chrysogenum* diesen Wert deutlich überschreitet, wird mit verschiedenen Rührersystemen gearbeitet, von denen das Umwurfsystem im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

3.1.3.3 Aufbau des Biostat UD im Umwurfbetrieb

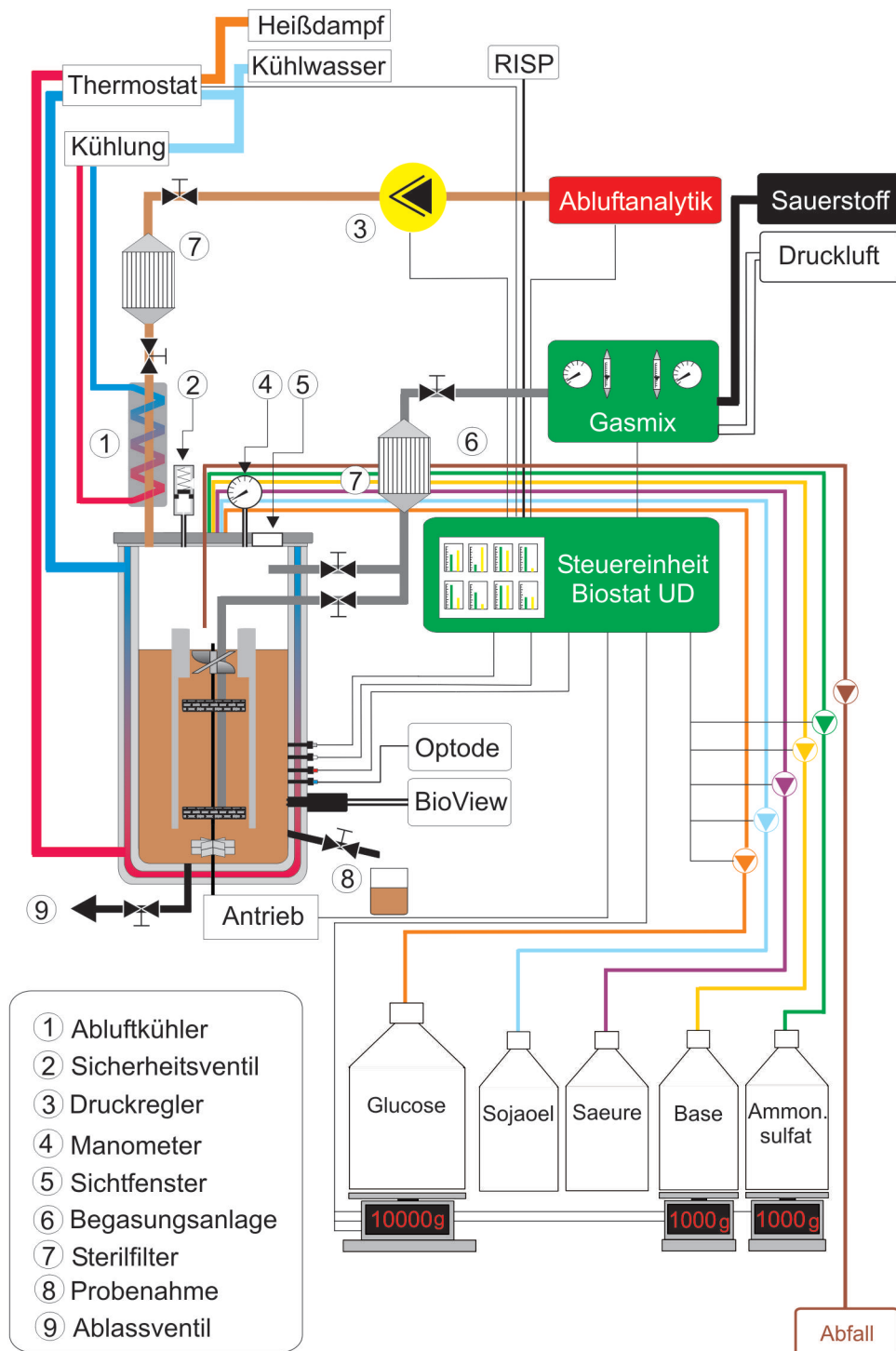


Abb. 3.3: Schematische Abbildung des Produktionsreaktorsystems Biostat UD. Der Reaktor wurde für einige Kultivierungen als Umwurfreaktor betrieben.

Das Schema in Abbildung 3.3 auf der vorigen Seite zeigt das Reaktorsystem mit einer Modifikation des Serienmodells zum Umwurfreaktor. Zusätzlich zum Reaktorsystem wird das Fluoreszenzspektrophotometer BioView-Sensor der Firma Delta, der optische Sauerstoffsensor Fibox 3 der Firma PreSens und ein Abgasanalysesystem der Firma ABB mit einem Messkanal für Sauerstoff (Typ Magnos) und einem Messkanal für Kohlendioxid (Typ URAS 14) verwendet. Neben der Variation von Drehzahl und Gasvolumenstrom bestehen zwei weitere Möglichkeiten, den Gelöstsauerstoffgehalt zu beeinflussen. Durch ein Gasmix-Modul kann der zur Begasung verwendeten Luft Sauerstoff beigemischt werden. Der maximale Zuluftvolumenstrom beträgt 30 L/min. Die Sauerstoffzumischung beträgt 0-100 %. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, den Reaktorinnendruck zu variieren. Der maximale Überdruck beträgt 2,0 bar. Dieser Bereich wird nicht ausgeschöpft. Durch die Erhöhung des Drucks kommt es zu Abweichungen der Pumpleistung der Peristaltikpumpen, über die Säure-, Base- und Feedzugabe erfolgt. Oberhalb eines Druckes von 1,5 bar geht die Pumpleistung gegen null und es strömt Luft aus dem Reaktor durch die Pumpen in die Vorratsgefäße. Um die tatsächliche Fördermenge der Pumpen kontrollieren zu können, besteht die Möglichkeit, drei der Substratbehälter auf Waagen mit 15 kg bzw. 35 kg maximaler Wägelast (EA-Baureihe ,Fa. Sartorius) zu stellen und die Masseänderung zu dokumentieren. Eine Dokumentation der zugeführten Menge Sojaöl und Schwefelsäure hat sich als nicht notwendig erwiesen, da während der Kultivierung Sojaöl nur pulsweise zugeführt wird und, bei ausreichender Glucosekonzentration, keine Schwefelsäure benötigt wird.

Sämtliche Sonden werden über 25 mm-Standardstutzen in den Reaktor geführt. Die Probenahme erfolgt über das Bodenventil. Vor und nach der Probenahme wird das Ventil mit Heißdampf (Druck 1,5 bar - 2 bar) für 15 min sterilisiert. Während der übrigen Zeit ist das Ventil mit einer Schutzkappe verschlossen und vor Kontamination geschützt. Die Sterilisation von Luft und Sauerstoff, die für die Begasung verwendet werden, erfolgt durch einen Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 μm der Firma Pall, der sich zwischen der Mischeinheit und dem Reaktor befindet. Auf einen Abluftfilter wird verzichtet, da das Medium bei der Sterilisation stark aufschäumt und den Filter verblocken kann. Aufgrund der hohen Viskosität des Mediums während der Kultivierung ist mit einem Austrag von Organismen nicht zu rechnen. Da während der Kultivierung große Mengen Glucosesirup und Ammoniaklösung zugeführt werden, ist es erforderlich, das Kulturvolumen mit Hilfe eines Überlaufrohres einzustellen. Um die Sterilsicherheit und den Reaktorinnendruck aufrecht zu halten, wird die Ablaufleitung durch eine Peristaltikpumpe und eine Bakterienfalle geführt.

Vor der Kultivierung werden die Medienkomponenten ohne Glucose im Reaktor mit Wasser vermischt und auf den pH-Wert 6,5 eingestellt. Danach werden Reaktor, Sterilfilter und Medium in place sterilisiert. Als Sterilisationsbedingungen werden 121 °C für eine Dauer von 30 min gewählt.

3.1.3.4 Aufbau des Reaktorbehälters im Umwufbetrieb

Für die Kultivierung im Umwufbetrieb wird in den Reaktorkessel (Länge 780 mm \varnothing 258 mm) ein Leitrohr (Länge 400 mm, \varnothing 150 mm) eingebaut, in dem 2 Sintermetallstäbe (Länge 100 mm, \varnothing 25 mm) eingelassen sind. Zwischen dem Reaktorboden und der Unterkante des Leitrohrs besteht ein Spalt von 120 mm. An der Oberkante wird ein Metallring in das Leitrohr eingebracht, das den oberen Eingang auf 120 mm verengt. Die Kulturbrühe wird mit Hilfe von Rührorganen durch das Leitrohr gefördert. Am oberen Eingang, innerhalb des Metallrings, befindet sich ein vierblättriger Leitrohrpropeller mit 115 mm Durchmesser. Unterhalb des Leitrohrs sind zwei sechsbältrige Scheibenrührer (\varnothing 105 mm) bündig übereinander und gespiegelt zueinander angeordnet. In Abbildung 3.4 sind zwei Fotos des Umwufreaktors in der

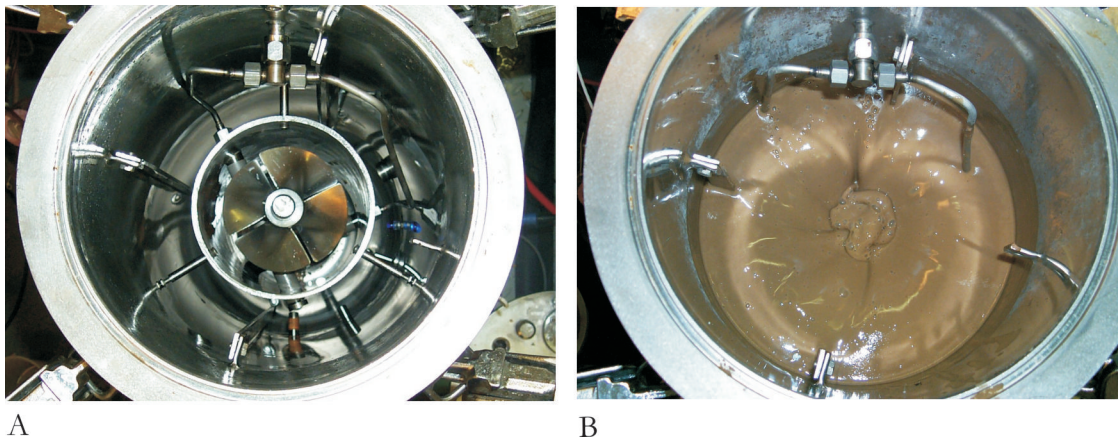


Abb. 3.4: Die beiden Fotos zeigen die Aufsicht auf das Umwufsystem. Teil A zeigt den Leitrohrpropeller und das Leitrohr im entleerten Reaktor. Teil B zeigt den geöffneten Reaktor in Betrieb bei 400 rpm Rührerdrehzahl.

Aufsicht gezeigt. Im Teil B der Abbildung ist zu erkennen, wie Kulturbrühe über den Rand in das Leitrohr strömt. Im Gegenstrom dazu werden die Gasblasen im Leitrohr nach oben geführt, was eine erhöhte Verweilzeit der Blasen in der Kulturbrühe zur Folge hat. An der Reaktorwand sind die eingehängten Stromstörer zu erkennen. Durch diese wird verhindert, dass der Reaktorinhalt in Rotation versetzt wird.

3.1.4 Messung des intrazellulären pH-Wertes

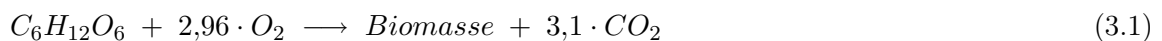
Der pH-sensitive Farbstoff BCECF ist ein Carboxyfluoresceinderivat, das primär in der Cyto-metrie eingesetzt wird. Die Anregungswellenlänge liegt bei 482 nm, der pK_a -Wert beträgt 7,0 und liegt somit im Bereich des pH-Wertes des Cytoplasmas. Als Reagenz wird der Fluoreszenz inaktive Acetoxymethylester eingesetzt, der in den Zellen durch unspezifische Lipasen in die BCECF-Säure umgesetzt wird. Da der BCECF-Ester deutlich besser die Zellmembran passiert als die Säure, besteht über mehrere Stunden die Möglichkeit, den intrazellulären pH-Wert zu

messen. Darüber hinaus fluoresziert der Ester im Gegensatz zur Säure nicht, was Störungen durch extrazelluläre Farbstoffmoleküle minimiert.

Vor der Messung werden die Zellen aus der Kulturbrühe durch Zentrifugation abgetrennt, anschließend in EBSS-Puffer gewaschen. Etwa 100 mg Zellmasse werden in 10 mL EBSS-Puffer resuspendiert und mit BCECF versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min werden die Zellen von extrazellulärem BCECF getrennt und portioniert. Acht Proben werden für die Erstellung einer Kalibrationsreihe verwendet. Zwei Proben werden vermessen. Die Kalibrationsreihe wird unter Verwendung von Pufferlösungen (pH-Bereich 5 - 8,0) und des Antibiotikums Hygromycin erstellt. Durch das Einwirken von Hygromycin werden die Zellwände permeabel für Protonen. Der intrazelluläre pH-Wert wird dem extrazellulären angeglichen. Die Messung wird mit einem Fluoreszenzspektrophotometer Hitachi F 4500 in Suprasil-Halbmikroküvetten der Fa. Helma durchgeführt. Ausgewertet wird der Messpunkt bei einer Exzitationwellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

3.2 Messung des Sauerstoffeintrags

Um den Sauerstoffeintrag zu beobachten wird ein chemische System, bestehend aus Sulfit und Cobalt als Katalysator, verwendet. Gegenüber dem biologischen System bestehen die Vorteile der einfachen Reproduzierbarkeit des Sauerstoffverbrauchs, da Faktoren wie Animpfdichte, Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselzustand nur im biologischen System auftreten und hier den Sauerstoffbedarf beeinflussen, sowie des geringeren Zeitbedarfs für ein Experiment. Zwischen den Sauerstoff umsetzenden Reaktionen besteht ein entscheidender Unterschied. Nimmt man *Escherichia coli* als biologisches Modellsystem an, erhält man als Bruttoreaktionsgleichung des Sauerstoffumsatzes bei vorliegender Glucoselimitierung:



Je Gramm Biomasse werden innerhalb einer Stunde 8,3 mmol Sauerstoff zu 8,7 mmol Kohlendioxid umgesetzt. Es kommt zu einem Bruttovolumenstrom aus dem Kolben [38]. Im Gegensatz hierzu resultiert aus dem chemischen Sauerstoffumsatz ein Volumenstrom in den Kolben:



Somit ist der, mit Hilfe der Sulfitmethode ermittelte Sauerstoffübergang nicht direkt auf ein Kultivierungsexperiment übertragbar.

Für die Experimente im Kolben wird eine 1 %ige Lösung von Natriumsulfit in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) hergestellt, in eine Glasflasche mit Schraubverschluss abgefüllt, verschlossen und in einem Trockenschrank, gemeinsam mit den Kolben, auf 30 °C - der Temperatur, bei der auch die Schüttelkolbenexperimente durchgeführt werden - temperiert. Die Sulfitlösung wird maximal 24 h aufbewahrt. Für ein Experiment werden der Sulfitlösung 0,1 mmol/L

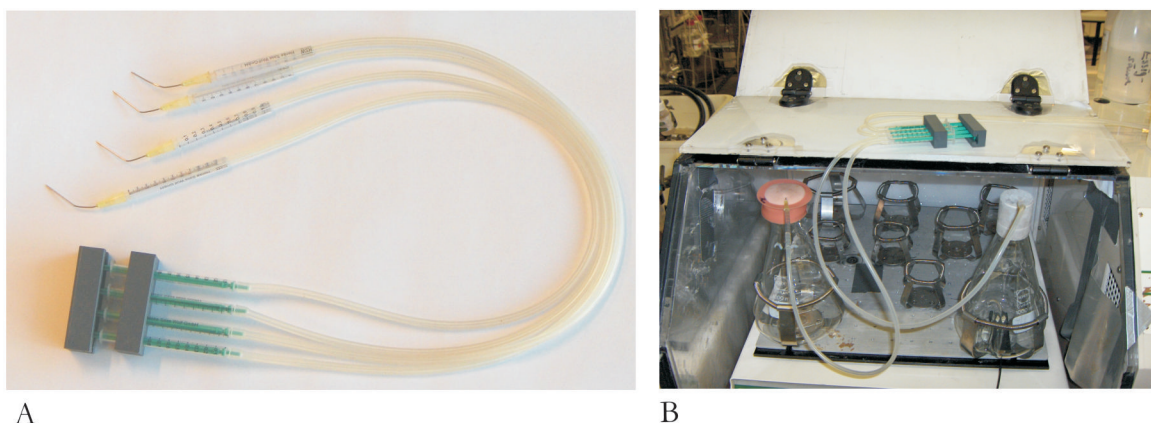


Abb. 3.5: Teil A der Abbildung zeigt die Vierkanalspritze, Teil B die Anwendung als Zweikanalspritze an je einem Kolben mit Silikonkappe und Alukappe

Cobalt-(II)-ionen hinzugefügt. Dies erfolgt durch die Zugabe von Cobalt-(II)-sulfatlösung mit einer Konzentration von 10 mmol/L mit Hilfe einer Vierkanalspritze, wie sie in Abbildung 3.5 dargestellt ist. Danach wird der Schüttler eingeschaltet. Nach dem Ende des Experiments werden die Kolben entleert und mit einer wässrigen Lösung aus je 5 % Essigsäure und Wasserstoffperoxid, danach mit VE-Wasser gespült.

Bei den Experimenten mit Superspinnern und dem Biostat B-Reaktor wird von dieser Prozedur geringfügig abgewichen. In den Experimenten mit Superspinnern wird jeweils eine 0,5 %ige Sulfitlösung eingesetzt. Als Temperatur wird 37 °C gewählt, da die Mehrzahl der Kultivierungen von Säugerzellen bei dieser Temperatur durchgeführt werden. Bei den Messungen im Biostat B-Reaktor wird die 1 %ige Sulfitlösung im Reaktor hergestellt. Die Begasung erfolgt mit Druckluft.

Der Sauerstoffeintrag wird anhand des Verlaufs des Gelöstsauerstoffgehalts bestimmt. Für die Messungen in Kolben und Superspinnern wird ein System der Fa. Presens, Typ Oxy 4 verwendet. Aufgrund des modularen Aufbaus des Gerätes aus optoelektronischem System, Lichtleiter und Messadapter, wie sie in Abbildung 3.6 auf der folgenden Seite dargestellt ist, besteht die Möglichkeit der Anpassung an spezielle Anwendungen. Die Bestimmung des Gelöstsauerstoffs basiert bei diesem System auf der Messung der Fluoreszenzlebenszeit eines Rutheniumkomplexes mit organischen Liganden. Durch Sauerstoff kommt es zu Quench-Vorgängen, wodurch die Fluoreszenzlebenszeit abnimmt. Der Vorteil der Lebenszeitmessung gegenüber der Messung der Amplitude besteht in der geringeren Störanfälligkeit. Die Amplitude wird im Gegensatz zur Lebenszeit erheblich durch das Ausbleichen des Farbstoffes, Intensitätsschwankungen der Exzitationslichtquelle und Absorptionsvorgänge beeinflusst. Diese Umempfindlichkeit gegen äußere Einflüsse ermöglicht sowohl die Messung bei ruhendem Messsystem und schwingendem Farbstoffpad als auch eine längere Benutzung des Pads bis zum Ausbleichen. Die Messungen im Bioreaktor erfolgen mit einem Fibox 3 System, ebenfalls von der Fa. Presens. Es handelt

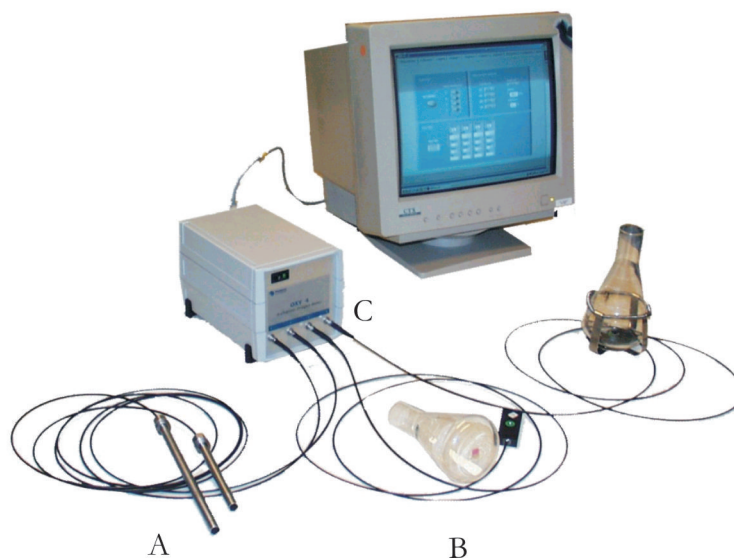


Abb. 3.6: Das Messsystem besteht aus einem Adapter, der den Lichtleiter mit dem Farbstoffpad verbindet, und je nach Einsatz angepasst werden kann (Beispielsweise A: Reaktorsonde, angepasst an die Elektrodenform oder B: Adapter für die Messung im Kolben.) und dem optoelektronischen System C, das über einen PC gesteuert wird.

sich um ein Einkanalssystem, dessen Aufbau und Messprinzip identisch zum 4-Kanalssystem Oxy 4 sind. Über die Software ist jedoch eine Messfrequenz von 3 Hz realisierbar.

Um den Einfluss des Sulfits auf das Ansprechverhalten der Sonden zu ermitteln, werden einige Messungen mit der Stickstoffmethode durchgeführt. Hierbei wird ein Reaktor abwechselnd mit Luft und Stickstoff begast, um Schwankungen des Gelöstsauerstoffgehalts zu erzeugen. In einer ersten Versuchsreihe wird auf diese Weise die Ansprechzeit bei verschiedenen Temperaturen ermittelt. In einer weiteren Versuchsreihe, bezeichnet mit „Stickstoffmethode multi“ wird durch den alternierenden Wechsel von Luft- und Stickstoffbegasung die Reproduzierbarkeit der Messung überprüft.

4 Ergebnisse der Sauerstoffmessung

4.1 Charakterisierung von Messsystem und Gefäßen

4.1.1 Vergleich von Optode und Clark-Elektrode

Mit diesen Untersuchungen soll das Ansprechverhalten und die Reproduzierbarkeit der Messungen mit der Optode im Vergleich zu synchron durchgeführten Messungen mit einer Elektrode ermittelt werden. Für die notwendigen Messungen wird eine Biostat B Steuereinheit (Sartorius) mit einem 2 L Reaktorgefäß verwendet. Die Begasung erfolgt mit einer Steuereinheit und dem Gasmischsystem eines Biostat UD - Systems (Sartorius). Die Begasungsrate beträgt 2,5 vvm. Für die Messungen in diesem Abschnitt werden die Sulfitmethode und die Stickstoffmethode angewandt. Die Sulfitmethode dient primär zur Ermittlung der Ansprechzeit. Mit der Stickstoffmethode soll zusätzlich ermittelt werden, ob ein nennenswerter Einfluss auf die Messmethode durch die Eigenschaften der Sulfit-/Cobalt-Lösung entsteht. Mit diesen Messreihen soll auch der Einfluss der Temperatur auf das Ansprechverhalten ermittelt werden. In einer weiteren Versuchsreihe (Stickstoffmethode multi) soll die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse geprüft werden. Die Datenaufnahme erfolgt, je nach Messreihe, mit unterschiedlichen Systemen.

Bei den Messungen zur Ermittlung der Ansprechzeit mit der Sulfit- und der Stickstoffmethode wird die Elektrode über das Sauerstoff-Messmodul eines Biostat E (Sartorius) an eine AD-Wandler-Karte angeschlossen. Die Daten der Optode werden über die Analog-Schnittstelle des opto-elektronischen Systems auf die selbe AD-Wandler-Karte ausgegeben. Mit dem Programm LabTech-Notebook erfolgt die Datenerfassung.

Bei den Messungen nach der Stickstoffmethode werden die Daten mit der Messsoftware der Firma PreSens für die Optode und über die Steuereinheit Biostat B und die RISP-Software für die Elektrode aufgezeichnet.

Die für die Messung verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

	Sulfitmethode	Stickstoffmethode	Stickstoffmethode (multi)
Temperatur [°C]	25, 30, 40	25, 30, 40	25
Drehzahl [1/min]	1000	1000	50, 250, 500, 1000
Messfrequenz	10/s		1/s
Begasung [L/min]	5		
Referenz	InPro 6000, Fa. Mettler Toledo		

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Bedingungen, unter denen die Versuche zur Ermittlung der Ansprechzeit und Reproduzierbarkeit der Messwerte durchgeführt wurden.

4.1.1.1 Messung der Ansprechzeit

Die Ergebnisse der Messungen sind in den folgenden Diagrammen dargestellt. Bei allen Messreihen wird festgestellt, dass Veränderungen des Systems, ausgehen von einem Gleichgewichtszustand, von der Optode schneller detektiert werden als von der Elektrode, unabhängig von der verwendeten Methode und der eingestellten Temperatur. Mit der Erhöhung der Temperatur geht eine Verringerung dieser Differenz einher.

Steigender Sauerstoffgehalt, insbesondere nahe des Sättigungsgleichgewichts, wird von der Elektrode schneller detektiert. Die Messreihen werden nicht auf höhere Temperatur erweitert, da die alkalische Umgebung in der Sulfitlösung in Kombination mit einer Temperatur über 40 °C den Sensorkopf der Optode schädigen, indem das Farbstoff-Pad von der Glasoberfläche abgelöst wird. Darüber hinaus sind die Anwendungen in der Biotechnologie, bei denen die Sauerstoffmessung und -kontrolle essenziell sind, meist auf einen Bereich zwischen 25 °C und 40 °C begrenzt.

Bei allen Versuchen ist das Signal-Rauschverhältnis der Optode ungünstiger als bei der Elek-

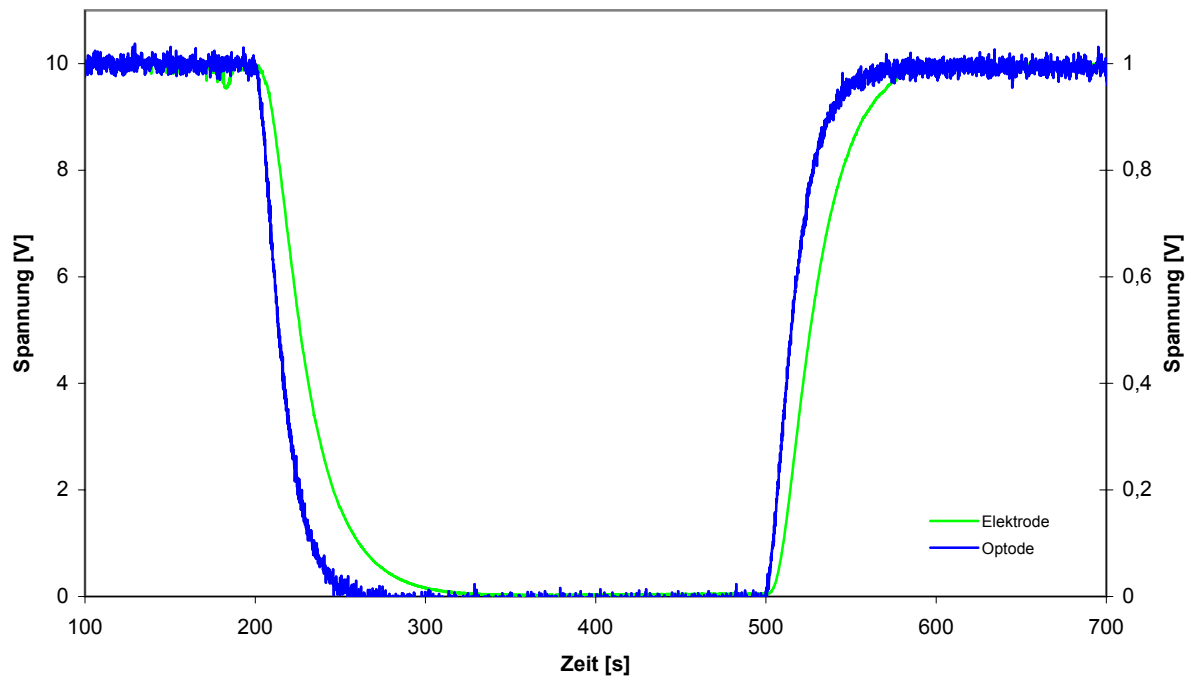


Abb. 4.1: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 25 °C mit der Sulfitmethode.

trode. Eine der Ursachen hierfür ist die niedrigere Signalspannung am Analogausgang der Optode (1 V) gegenüber dem Messmodul mit der Elektrode (10 V). Diese Spannungen entsprechen jeweils 100 %iger Sauerstoffsättigung. Zunächst werden die Werte aus den Messungen mit der Sulfitmethode dargestellt. Die Messwerte von Optode und Elektrode bei 25 °C sind

in der Abbildung 4.1 auf der vorigen Seite dargestellt.

Das Signal der Optode geht linear gegen 0, während sich das Signal der Elektrode mit einem negativ exponentiellen Verlauf dem Wert 0 nähert. Beide Signale nähern sich bei der Sättigung der Lösung mit Luftsauerstoff asymptotisch dem Gleichgewichtszustand.

Dass sich das Signal-Rauschverhältnis zwischen 0 und 100 % Sättigung nicht ändert, ist ein Indiz dafür, dass das Messrauschen erst bei der Ausgabe der Daten entsteht und nicht bereits bei der Messung.

Der Effekt, der durch die Erhöhung der Temperatur entsteht ist gering. In Abbildung 4.2

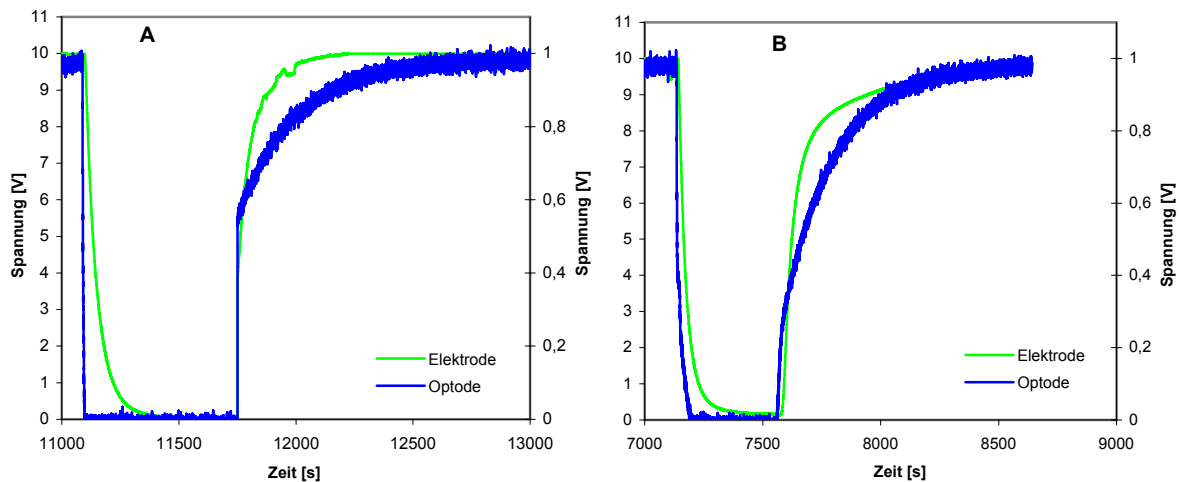


Abb. 4.2: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 30 °C und 40 °C mit der Sulfitmethode.

sind die Sauerstoffverläufe aus Experimenten bei 30 °C (A) und 40 °C (B) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Zeitspanne, innerhalb der der gemessene Sauerstoffgehalt von 100 % auf 0 % absinkt, vergrößert. Im Bereich niedriger Sauerstoffkonzentration verringert sich der Betrag der Steigung der Kurve stärker als im Bereich hoher Sauerstoffkonzentration. Nimmt die Sauerstoffkonzentration wieder zu, ist zu beobachten, dass die Steigung der Kurve bei höherer Temperatur früher abnimmt als bei niedrigerer Temperatur. Ein Einfluss der Temperatur auf das Verhalten der Elektrode kann nicht festgestellt werden.

4.1.1.2 Untersuchung zum Einfluss der Messmethode

Bei Messungen nach der Stickstoffmethode wird der gleiche Effekt beobachtet. Da das Herstellen des sauerstofffreien Zustandes durch Begasung mit Stickstoff länger dauert, als mit der Sulfitreaktion, ist der Effekt schwächer ausgeprägt, wie aus Abbildung 4.3 auf der folgenden Seite hervorgeht. Bei höherer Temperatur verringert sich der Unterschied zwischen Elektrode und Optode weiter, wie in Abbildung 4.4 auf der folgenden Seite gezeigt ist. Lediglich im Bereich niedriger Sauerstoffkonzentration sind bei der Abnahme des Sauerstoffgehalts

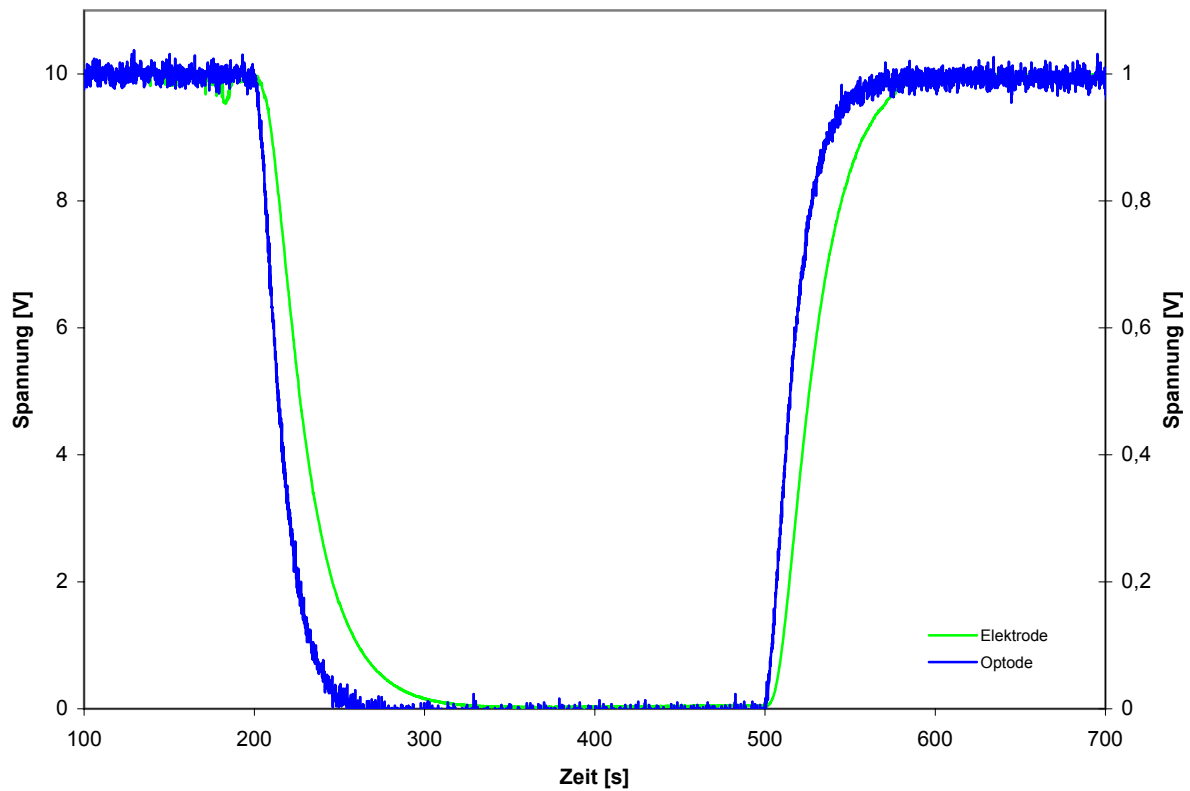


Abb. 4.3: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 25 °C mit der Stickstoffmethode.

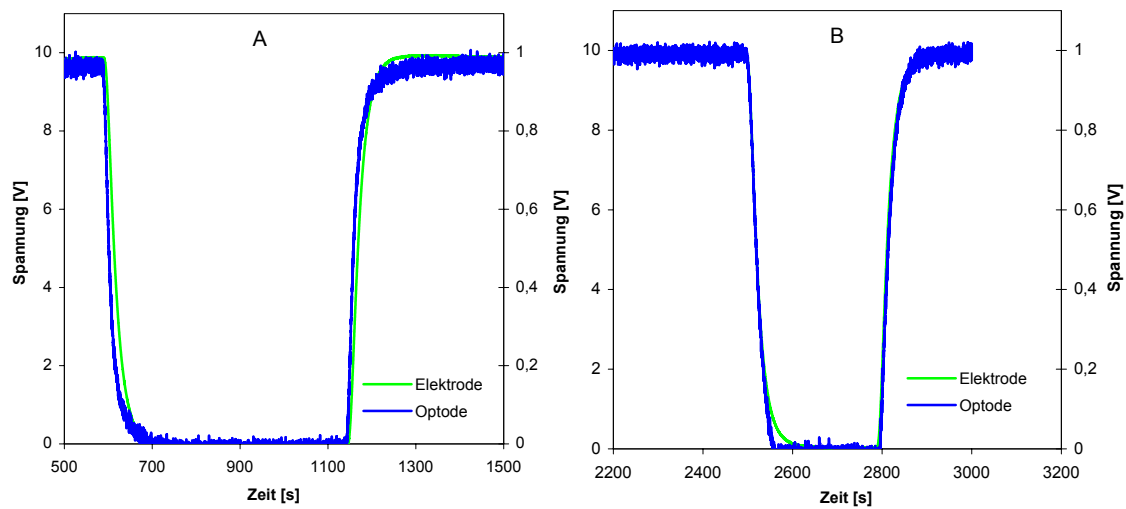


Abb. 4.4: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 30 °C und bei 40 °C mit der Stickstoffmethode.

verschiedene Verläufe zu erkennen. Ursache für diese Abweichung ist das Flüssigkeitsvolumen in der Elektrode, das zwischen Membran und Elektrode eingeschlossen ist. Da der Sauerstoff diesem Bereich nur durch Diffusion in das die Elektrode umgebende Medium entzogen werden

kann (in dem betrachteten Zeitraum ist der elektrolytische Abbau von Sauerstoff durch die Elektrode vernachlässigbar), liegt hier ein limitierendes Moment der Messmethode vor. Der Verlauf des Sauerstoffgehalts ist, im Gegensatz zu den Experimenten nach der Sulfitmethode stetig, es treten in keinem Fall Knicke auf. Es kann daher festgehalten werden, dass es während des Sauerstoffanstiegs zu einem Einfluss auf die Optode durch die Methode zur Herstellung des sauerstofffreien Zustands kommt. Das Ende eines statischen Zustands zum Übergang in einen dynamischen Verlauf der Sauerstoffkonzentration wird durch die Optode stets schneller und eindeutig detektiert. Die Abweichungen zwischen den t_{90} -Werten der beiden Sonden, die durch die Vorgehensweise (Sulfit oder Stickstoff) zur Herstellung des sauerstofffreien Zustands auftreten, betragen ca. 3 min. Eine Ursache für dieses Phänomen wurde nicht gefunden. Möglicher Weise nimmt die Basizität der Sulfitlösung oder der pH-Wert-Wechsel während der Reaktion Einfluss auf das Silikon, in dem der Fluoreszenzfarbstoff immobilisiert wurde. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass es sich bei der verwendeten Sonde um einen Prototyp handelt.

4.1.1.3 Untersuchung zur Genauigkeit und Präzision der Messmethoden

Mit der Versuchsreihe Stickstoffmethode multi wird ermittelt, ob die Verläufe der Messdaten reproduzierbar sind. Hierfür werden Experimente in einem Biostat B Reaktor mit 2 L Arbeitsvolumen bei verschiedenen Rührerdrehzahlen eingestellt. Mit Hilfe der Steuereinheit des Biostat UD werden jeweils 4 identische Zyklen mit einem Wechsel von Stickstoff und Luftbegasung generiert. Die Temperatur beträgt bei allen Experimenten 30 °C

Beim Vergleich der Daten von Optoden- und Elektrodenmessung in Abbildung 4.5 auf der folgenden Seite fällt auf, dass die Werte der Elektrode nach dem Wechsel von Stickstoff- auf Luftbegasung deutlich über 100 % ausschwingt und dann mit einem exponentiellen Verlauf auf den Wert 100 % zurückkehrt. Die Optode zeigt dieses Verhalten nicht, sondern strebt direkt dem Wert von 100 % zu. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Verläufe konnte nicht gefunden werden. Ursache ist nicht das Begasungssystem, da die Optode den erwarteten Verlauf detektiert hat. Bei Verwendung der Sulfitmethode und der Stickstoffmethode unter Anwendung der Datenaufzeichnung mit der AD-Wandlerkarte, die Daten sind in den Abbildungen 4.1 bis 4.4 zusammengestellt, konnte der Verlauf der Sauerstoffsättigung, wie in Abbildung 4.5 auf der folgenden Seite von der Elektrode detektiert, nicht reproduziert werden. Ein Fehler bei der elektronischen Datenauswertung kann daher ebenfalls ausgeschlossen werden, da eine Veränderung der Drehzahl auch eine Veränderung des Verlaufs der Elektrodensignale erzeugt, wie aus Abbildung 4.6 auf der folgenden Seite hervorgeht.

Wird die Drehzahl des Rührers verringert, verläuft der Anstieg des Messsignals im Bereich der Sauerstoffsättigung flacher. Das Überspringen ist schwächer ausgeprägt. Durch eine Verringerung der Drehzahl von 500 rpm auf 250 rpm wird ein besonders starker Effekt bezüglich der

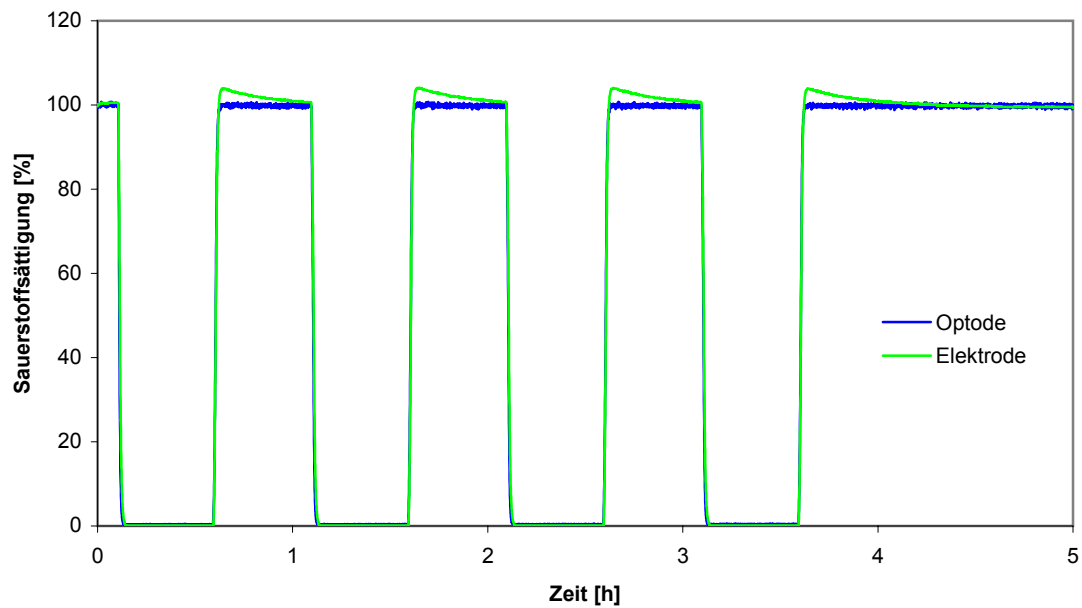


Abb. 4.5: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 1000 rpm mit der Stickstoffmethode mit mehrfacher Wiederholung.

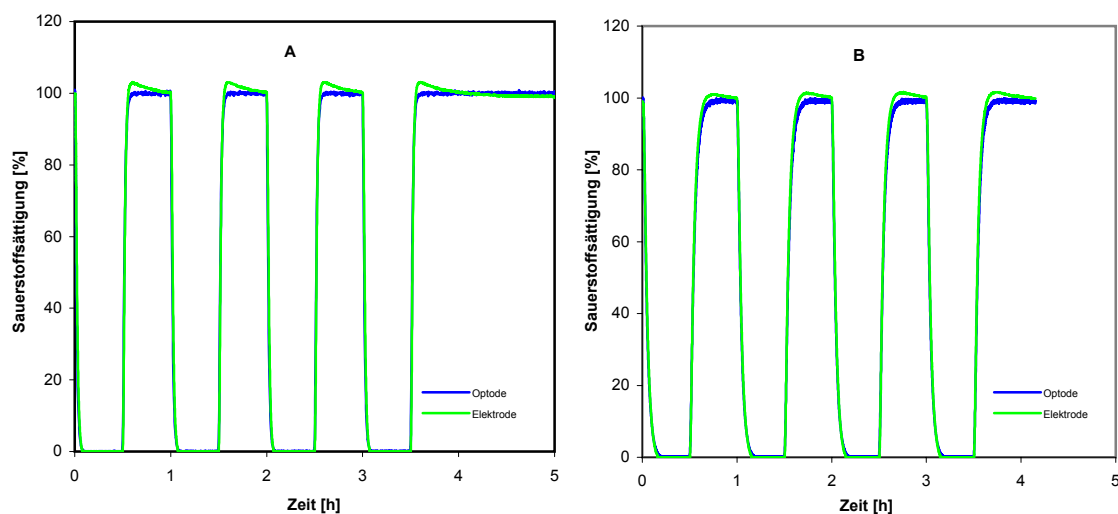


Abb. 4.6: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 500 rpm und 250 rpm und Wechselbegasung mit Stickstoff und Luft

Signalverläufe erzielt. Während sich die Sauerstoffkonzentration beim Versuch mit 500 rpm nahezu linear dem Wert von 100 % bzw. 0 % nähert, ist im Versuch mit 250 rpm ein Verlauf zu erkennen, der in diesem Bereich deutlich abflacht und einen stetigen Kurvenverlauf beschreibt.

Wird die Rührgeschwindigkeit weiter auf 50 rpm reduziert, ist die Veränderung des Kurvenverlaufs gegenüber den Experimenten bei 250 rpm gering, wie Abbildung 4.7 auf der folgenden

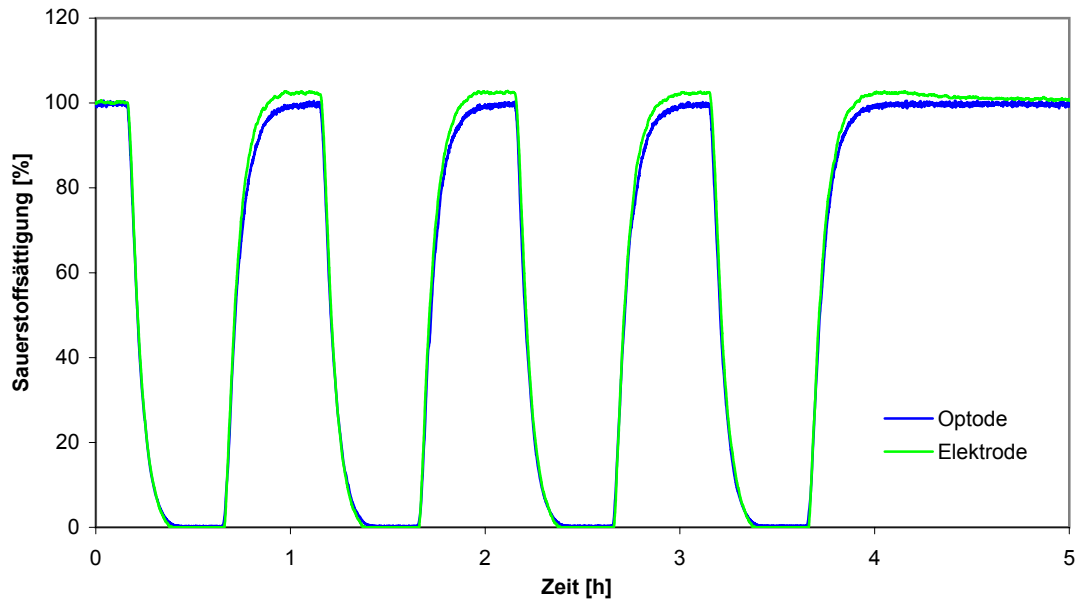


Abb. 4.7: Vergleich der Ansprechzeiten von Elektrode und Optode bei 50 rpm, Wechselgasung mit Stickstoff und Luft

Seite zeigt. Zu erkennen ist ebenfalls, dass der gesamte Anstieg bzw. Abfall der Sauerstoffkonzentration langsamer verläuft, was vermutlich auf eine verringerte Durchmischung im Reaktor zurückzuführen ist.

Betrachtet man das hydrodynamische Verhalten eines begasten Scheibenrührers unter dem Einfluss veränderter Drehzahl, ist festzustellen, dass sich der Wirkungsgrad ab einer bestimmten kritischen Drehzahl sprunghaft ändert. Dieser Punkt wird als Überflutungspunkt bezeichnet. Die Radialgeschwindigkeit des Rührorgans ist unterhalb des Überflutungspunktes zu gering, um das Gas in die Dispersionszone des Scheibenrührers zu fördern. Die Folge ist, dass die Blasen nicht dispergiert werden und sich eine Trombe um den Rührer bildet, so dass auch die Mischleistung des Rührers herabgesetzt wird [46].

$$n_{\text{Überflutung}} = 0,42 \cdot \left(\frac{g \cdot \dot{V}}{d_r^4} \right)^{\frac{1}{3}} \cdot \left(\frac{D}{d_r} \right)^{1,14} \quad (4.1)$$

Kritische Drehzahl	$n_{\text{Überflutung}}$
Erdbeschleunigung	$g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$
Gasvolumenstrom	$\dot{V} = 5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} = 8,3 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
Rührerdurchmesser	$d_r = 0,053 \text{ m}$
Reaktordurchmesser	$D = 0,131 \text{ m}$

Der Überflutungspunkt wird nach der Formel 4.1 [46] berechnet. Mit den Werten, die aus dem Versuchsaufbau resultieren, erhält man für den Überflutungspunkt eine Drehzahl von

331,61 rpm. Das sichtbare Resultat dieses Phänomens ist, dass sich die Verläufe der Messdaten bei der Verringerung der Drehzahl von 500 rpm auf 250 rpm besonders deutlich verändern. Beide Systeme weisen innerhalb des betrachteten Zeitraums sowohl hohe Präzision als auch eine hohe Genauigkeit auf. Drifteffekte können nicht beobachtet werden. Lediglich das Überspringen der Elektrode bei der Anwendung der Stickstoffmethode multi ist ein Phänomen, dass nicht geklärt werden konnte. Das Auftreten kann, nach Eliminierung aller sonstigen Einflüsse, nur auf das Zusammenwirken von Elektrode und Biostat B Steuereinheit zurückgeführt werden.

4.1.1.4 Fazit

Bewertet man die Ansprechzeit als qualifizierende Größe für die Eignung eines Sensors, so sind beide Sensoren aufgrund ihrer Ansprechzeiten in der Biotechnologie gleichermaßen einsetzbar. Die ermittelten Ansprechzeiten, die im Allgemeinen mit Hilfe der t_{90} -Zeit (Zeitraum bis zum

	Messwert (Sulfitmethode)	Elektrode	Optode
25°C	t_{10} [s]	44	42
	t_{90} [s]	45	44
30°C	t_{10} [s]	135	17
	t_{90} [s]	176	350
40°C	t_{10} [s]	98	42
	t_{90} [s]	391	460

Tab. 4.2: Zusammenfassung der Ansprechzeiten, die nach der Sulfitmethode durchgeführt wurden.

Erreichen von 90 % des zu erwartenden Messwertes) angegeben werden, sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt. Der ebenfalls angegebene t_{10} -Wert bezeichnet den Zeitraum, innerhalb dem die Sauerstoffkonzentration von 100 % auf 10 % abnimmt. Bezogen auf diese Werte ist die Ansprechzeit der Optode bei der Sauerstoffabnahme kürzer, bei Sauerstoffzunahme länger als die der Elektrode. Eine Änderung der Sauerstoffkonzentration wird von der Optode stets schneller detektiert.

Die Messungen mit der Stickstoffmethode in den Abbildungen 4.3 auf Seite 31 und 4.4 auf Seite 31 lassen den Schluss zu, dass die Verwendung der cobalthaltigen Natriumsulfit-Lösung keinen nennenswerten Einfluss auf die Ansprechzeit der beiden Sonden hat. Die Stickstoffmethode ist für die Bestimmung der Ansprechzeit nicht geeignet, da der Sauerstoffübergang aus der flüssigen in die gasförmige Phase bzw. umgekehrt der limitierende Faktor ist, nicht jedoch die Messmethode.

Die Präzision und die Genauigkeit beider Methoden innerhalb des mit der Stickstoffmethode multi untersuchten Zeitraums sind hoch. Das Überspringen der Elektrode, dass besonders

bei hoher Rührerdrehzahl sichtbar ist, tritt ausschließlich in dieser Messreihe auf. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen Effekt, der auf den apparativen Aufbau zurückzuführen ist. Basierend auf den Messdaten können beide Methoden als gleichwertig betrachtet werden. Vorteile für eine der Methoden können erst aus der Handhabung und Anwendung definiert werden:

- Die Elektrode ist im Gegensatz zur Optode auch für den Einsatz bei hoher Temperatur und aggressiven Mediumbedingungen geeignet.
- Die Optode muss vor der Benutzung nicht polarisieren. Sie ist im Gegensatz zur Elektrode nach ca. 15 min, nicht erst nach 6 h einsatzbereit.
- Die Handhabung des aggressiven Elektrolyten entfällt bei der Optode.
- Im Gegensatz zur Elektrode hat die Optode keine elektrischen Verbindungen zum Messgerät. Eine Sterilisation im Autoklaven ist somit einfacher möglich.
- Die Optode muss nicht vor jeder Messung kalibriert werden. Darüber hinaus kann die Kalibration vor einer Kultivierung, unsteril und außerhalb des Reaktorgefäßes durchgeführt werden. Bei großen Reaktoren können so Zeit und Materialkosten eingespart werden.
- Aufgrund der Signalintensität ist die Messung mit der Elektrode bei hoher Sauerstoffkonzentration, die mit der Optode bei niedriger Sauerstoffkonzentration, besonders sensitiv.
- Die Lebensdauer der Optode ist durch das Ausbleichen des Farbstoffes begrenzt. Die Aufnahme von $5 \cdot 10^5$ bis 10^6 Messpunkten war ohne eine signifikante Qualitätsänderung des Messsignals möglich. Betrachtet man eine Messrate von 1 min^{-1} bei biologischen Prozessen als hinreichend, ist eine durchgehende Messung von 347 - 694 Tagen Dauer möglich. Die Lebensdauer der Elektrode ist nahezu unbegrenzt.
- Die Optode ist, im Gegensatz zur Elektrode, fast unbegrenzt miniaturisierbar. Darüber hinaus ist die optische Messung nicht invasiv, während die Elektrode den Sauerstoff kathodisch zum Anion reduziert, das in wässriger Lösung als Hydroxid-Ion vorliegt. Unter Standardbedingungen sind $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ Sauerstoffatome in molekularer Form je Milliliter Wasser gelöst. Durch die Elektrode werden unter diesen Bedingungen, nach dem 1. Faradayschen Gesetz, $3,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/h}$ Sauerstoff umgesetzt [47]. Eine Dauermessung mit einer Elektrode in einem kleinen abgeschlossenen System ist folglich mit einem erheblichen Einfluss der Elektrode auf das System behaftet.
- Da der Farbstoff als flaches Pad auf eine Glasoberfläche aufgebracht wird, kann eine Messung durch jedes farblose und transparente Material hindurch erfolgen, ohne die Strömungsdyamik des Gefäßes zu beeinflussen.

Der zuletzt aufgeführte Aspekt ist im folgenden Kapitel bei der Charakterisierung der Schüttelkolben von großer Bedeutung. Verwendet wird für diese Messreihe ausschließlich die Sulfitmethode mit 1 % Sulfidlösung und 10^{-4} mol/L Cobaltsulfat-Zusatz.

4.1.2 Charakterisierung von Schüttelkolben

Schüttelkolben sind bei mikrobiologischen Arbeiten beispielsweise für Screening-Experimente, Kultivierungen im Labormaßstab und Vorkulturen für Reaktorkultivierungen unentbehrlich. Eine genaue Charakterisierung des Sauerstoffeintrags in das Medium, der durch viele Faktoren wie Flüssigkeitsoberfläche, Vermischung, Sauerstoffeintrag in den Kolben etc. beeinflusst wird, erfolgt meist nicht. In Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss

- die Variation des Kolbenverschlusses
- die Variation des Kolbenvolumens bei konstantem Flüssigkeitsinhalt
- die Variation des Flüssigkeitsvolumens bei konstantem Kolbenvolumen
- die Variation der Drehzahl des Schüttlers
- die Variation der Amplitude des Schüttlers

auf den Sauerstoffeintrag ausübt.

4.1.2.1 Variation des Kolbenverschlusses

Im Fachhandel ist eine große Vielfalt verschiedener Kolbenverschlüsse erhältlich. Eine Auswahl dieser Verschlüsse soll auf ihre Sauerstoffdurchlässigkeit untersucht werden. Daneben wird auch eine Messung mit einem Kolben ohne Verschluss und mit einem Wattestopfen durchgeführt. Für alle Versuche wurden Kolben mit einem Nennvolumen von 500 mL und einem Füllvolumen von 100 mL verwendet. Als Messgerät wurde das Vierkanalsystem Oxy4, Fa. PreSens, mit einer Messrate von 6 min^{-1} verwendet.

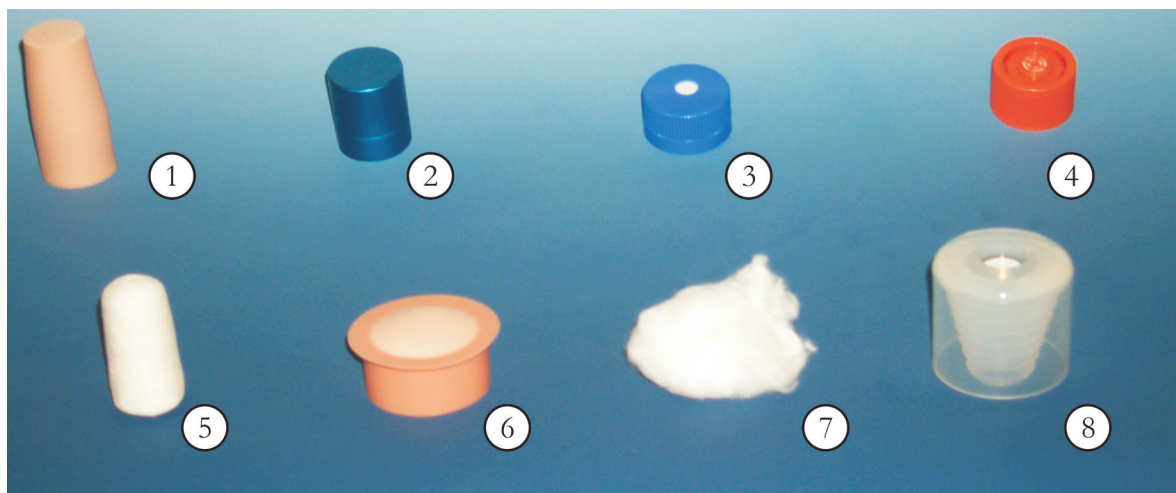


Abb. 4.8: Abbildung der verwendeten Kolbenverschlüsse

Die Diversizität der Messkurven in Abbildung 4.9 auf der folgenden Seite wirft die Frage auf, welche Charakteristika im Sauerstoffverlauf für die Beschreibung des Sauerstoffeintrags

	Bezeichnung in Abb. 4.8	Sterilbarriere	Preis pro Stück [Euro]
Silikonstopfen	1	Tiefenfilter	8
Alukappe	2	Steriler Spalt	2
Sartoriuskappe	3	Porenfilter	Nicht separat erhältlich
Corningkappe	4	Porenfilter	Nicht separat erhältlich
Zellstoffstopfen	5	Tiefenfilter	0,25
Silikonkappe	6	Tiefenfilter	10
Wattebausch	7	Tiefenfilter	ca. 0,05
Bugstopper	8	Tiefenfilter	15

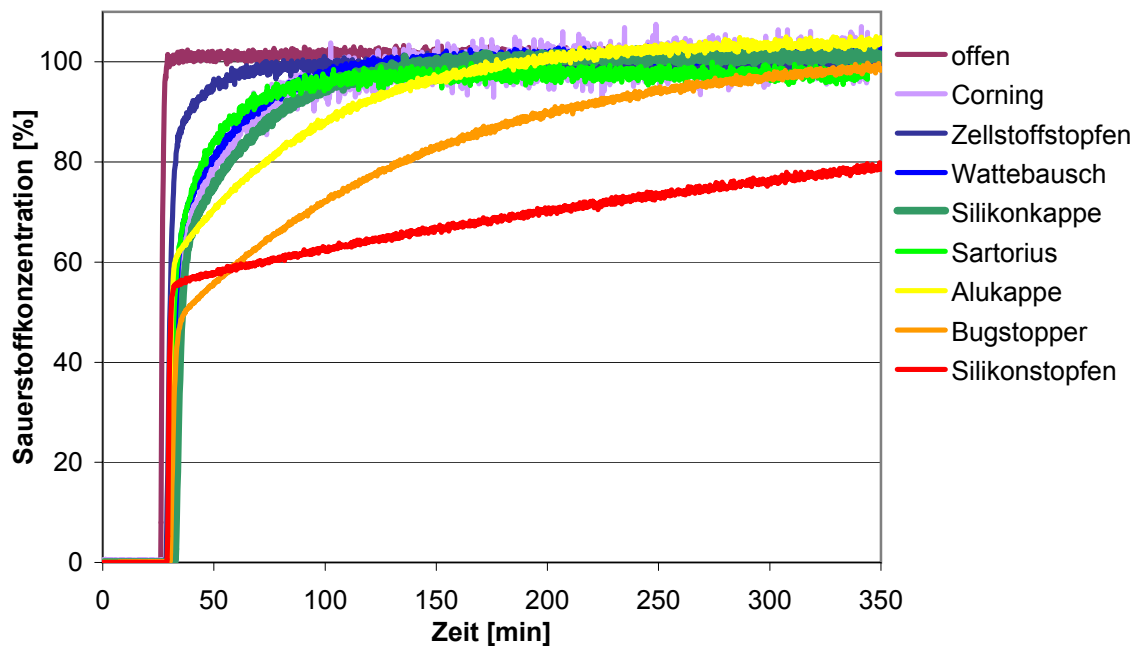
Tab. 4.3: Übersicht der verwendeten Kolbenverschlüsse ¹

Abb. 4.9: Zusammenstellung der Konzentrationsverläufe aus den Messreihe mit verschiedenen Kolbenverschlüssen.

relevant sind. Ein gängiges Verfahren zum Vergleich der Sauerstofftransferkapazität zweier Systeme ist die Betrachtung der k_La -Werte. Wie aus Abbildung 4.10 auf der folgenden Seite hervorgeht, weisen die k_La -Werte der Kolbenverschlüsse, bestimmt nach der statischen Methode, nur eine geringe Varianz auf. Im Gegensatz hierzu stehen die Unterschiede der t_{90} -Zeit, die im Bereich von 27,5 min bis 667 min variiert. Die Erklärung für das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Parameter ist auf das Sauerstoffreservoir im Gasvolumen (innere Gasphase) des Kolbens zurück zu führen.

Das Gesamtvolumen der verwendeten Kolben mit 500 mL Nennvolumen beträgt jeweils 617 mL. Bei der Verwendung von 100 mL Reaktionslösung verbleiben 517 mL Gasraum, in dem 107,58 mL Sauerstoff enthalten sind. Durch die Reaktion werden 98,65 mL Sauerstoff

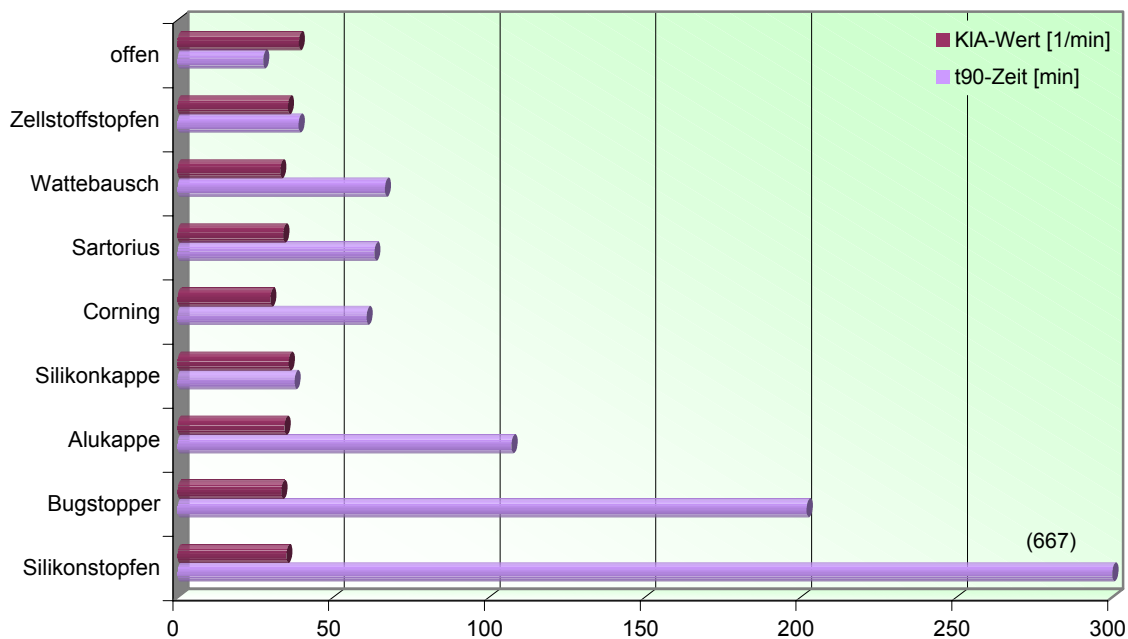


Abb. 4.10: Darstellung von $k_L a$ -Wert und t_{90} -Zeit der Messreihe mit Unterschiedlichen Kolbenverschlüsse

umgesetzt, was eine Volumenkontraktion zur Folge hat. Hierdurch erhöht sich das Sauerstoffvolumen, das dem System zur Verfügung steht, auf 133,49 mL. Der nach der statischen Methode bestimmte $k_L a$ -Wert wird somit maßgeblich durch den Sauerstoffübergang innere Gasphase \rightarrow Flüssigphase beeinflusst. Versuchparameter, die diesen Übergang beeinflussen, werden in dieser Versuchsreihe nicht variiert. Die Konvektion durch den jeweiligen Kolbenverschluss scheint - im betrachteten Zeitrahmen - ebenfalls nicht relevant. Deutliche Unterschiede entstehen aufgrund der Diffusion durch die Kolbenverschlüsse. Diese beeinflusst die Geschwindigkeit des Sauerstoffeintrags und somit auch die t_{90} -Zeit. Dieser Wert ist jedoch nicht ausreichend, um den Kurvenverlauf zu charakterisieren. Sowohl die Höhe des Anstiegs nach Abschluss der Oxidationsreaktion als auch die Steigung der Messkurve im weiteren Verlauf gehen nicht in den Wert ein. Eine Möglichkeit, diese Parameter zu berücksichtigen, ist die numerische Bestimmung der Integralsumme des Sauerstoffgehalts über die Zeit.

Für die Berechnung des Integrals wurde die Zeit bis zur 95 %igen Sauerstoffsättigung als Obergrenze gewählt. Dieser Wert ist ausreichend, um die Unterschiede der verschiedenen Verschlüsse charakterisieren zu können. Da sich das Messrauschen bei hoher Sauerstoffkonzentration erhöht, wurde von einer Integration bis zur vollständigen Sauerstoffsättigung abgesehen. In Abbildung 4.11 auf der folgenden Seite sind die Ergebnisse der Integration zusammenfassend dargestellt. Vergleicht man die Tendenzen, die aus den Werten der t_{90} -Zeit (Abb. 4.10) und den Integralsummen (Abb. 4.11 auf der folgenden Seite) resultieren, erkennt man hohe Übereinstimmung. Eine deutliche Abweichung weisen nur die Werte der Silikonkappe auf.

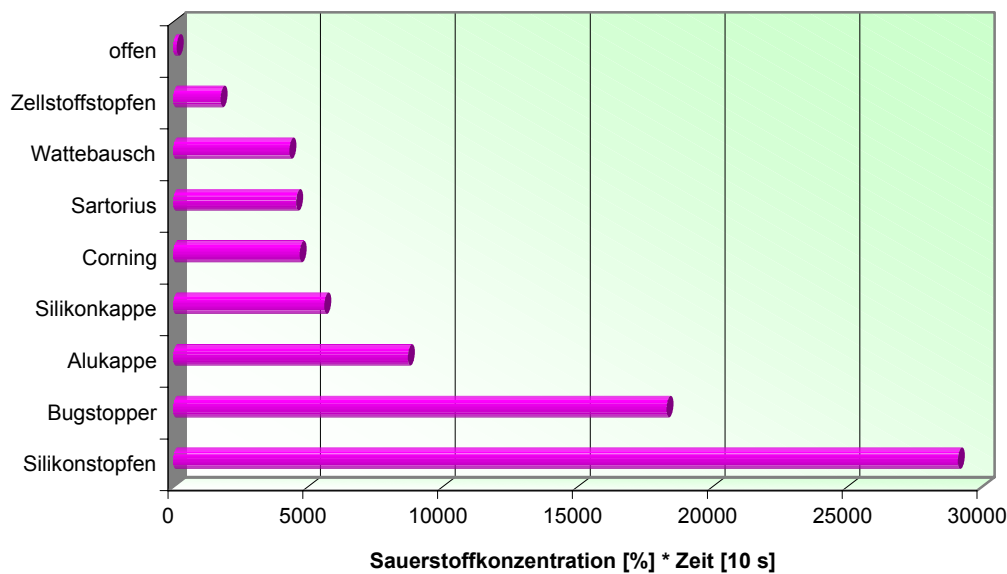


Abb. 4.11: Zusammenfassung der Integralsummen des Sauerstoffgehalts nach der Zeit in den Grenzen von t_0 bis $t_{(pO_2 = 95\%)}$

Die Kolbenverschlüsse können, basierend auf den Werten des Integrationsverfahrens, in drei Gruppen eingeteilt werden.

- Beim offenen Kolben und beim Kolben mit Zellstoffstopfen ist der Wert des Integrals am kleinsten. Der Sauerstoffdurchgang ist besonders hoch.
- Eine zweite Gruppe mit mittlerem Sauerstoffeintrag bilden die Membranverschlüsse der Firmen Sartorius und Corning sowie die Silikonkappe und der Wattebausch.
- Die dritte Gruppe bilden Alukappe, Bugstopper und Silikonstopfen. Der Sauerstoffdurchgang ist hier verhältnismäßig gering. Der Wert für den Silikonstopfen wurde, basierend auf einer linearen Regression der vorhandenen Daten extrapoliert.

Für weitere Untersuchungen werden die Alukappe und die Silikonkappe verwendet. Die Vorzüge dieser Kolbenverschlüsse sind die einfache Handhabung und Reproduzierbarkeit des Kolbenabschlusses. Die Silikonkappe passt auf alle verwendete Kolben und bietet einen guten Sauerstoffdurchgang. Der Sauerstoffdurchgang durch die Alukappe ist schwächer. Sie ist aber unempfindlicher gegen Spritzwasser, wie es beispielsweise bei der Verwendung von Kolben mit Schikanen auftreten kann.

4.1.2.2 Variation des Kolbennenvolumens

Nach dem Kolbenverschluss als Element, das den Sauerstoffeintritt in den Kolben limitiert, soll der Einfluss des Kolbenvolumens ermittelt werden. Die Variation des Kolbenvolumens hat

hat Einfluss auf zwei Größen, die entscheidende Parameter für den Sauerstoffeintrag in die Flüssigkeit darstellen:

- Die Flüssigkeitsoberfläche

Durch die Vergrößerung des Kolbenvolumens bei gleichem Flüssigkeitsvolumen wird eine größere Gasübergangsfläche hergestellt. Zu einer weiteren Beeinflussung der Flüssigkeitsoberfläche kommt es durch die Schüttelbewegung. Abhängig von der Schüttelgeschwindigkeit und der Dicke des bewegten Flüssigkeitsfilms, der wiederum Resultat der Flüssigkeitsmenge ist, bildet sich in jedem Kolben eine Flüssigkeitssichel aus, die eine für das Experiment spezifische Oberfläche hat. Die Oberflächenänderung dieser Sichel bei Variation der Drehzahl zu beschreiben, ist sehr komplex und mit den vorhandenen Daten nicht möglich. Eine Tabelle mit den Flüssigkeitsständen, die sich unter den spezifischen Versuchsbedingung im Kolben einstellen, befindet sich im Anhang A.4.

- Das Gasvolumen

In den Kolben steht jeweils ein bestimmtes Gasvolumen zur Verfügung. Der darin enthaltene Sauerstoff reicht nicht bei allen Experimenten aus, um die Sulfitoxidation abzuschließen. Auch der Sauerstoffgradient zwischen dem Gasraum im Kolben und der Umgebung hängt, neben der für die Oxidation benötigten Sauerstoffmenge, vom Gasvolumen im Kolben ab. Eine Tabelle mit den Gasvolumina unter den spezifischen Versuchsbedingung im Kolben befindet sich im Anhang A.4.

Begrenzt durch den Raum im Inkubator (Certomat M mit Inkubationshaube Certomat H, Fa. Sartorius) werden Kolben in den Größen 300 mL, 500 mL und 1000 mL eingesetzt. Kolben mit größerem Volumen können aufgrund ihrer Höhe nicht unter der Inkubationshaube bemesen werden. Alle Versuche dieser Sektion werden mit Silikonkappen als Kolbenverschluss und bei 30 °C durchgeführt. Variiert werden Füllvolumen (50 mL, 100 mL und 200 mL) Schüttelgeschwindigkeit (120 rpm und 240 rpm) und die Amplitude (2,5 cm und 5 cm). Ziel dieser Versuchsreihe ist, Parameter zu bestimmen, die den Sauerstoffeintrag in die Reaktionslösung beschreiben.

4.1.2.2.1 Untersuchungen mit einer Amplitude von 2,5 cm Zunächst sollen nur die Versuche betrachtet werden, die mit 2,5 cm Schüttelhub durchgeführt werden. Hierfür wird ein Certomat M mit Inkubationshaube Certomat H, Fa. Sartorius verwendet. Bei jedem Versuch werden je 2 Kolben mit 500 mL Nennvolumen parallel eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit des jeweiligen Versuchs beurteilen zu können. Wie Abbildung 4.12 auf der folgenden Seite zeigt, beeinflusst die Kolbengröße maßgeblich den Zeitraum, in dem das Natriumsulfit oxidiert wird und somit auch den $k_L a$ -Wert. Dies wird durch die Daten in Abbildung 4.13 auf Seite 43 bestätigt. Bei einer Drehzahl von 120 rpm wird der höchste $k_L a$ -Wert jeweils bei 50 mL Füllvolumen erreicht. Beim Kolben mit 300 mL Nennvolumen ist das auch bei 240 rpm der Fall.

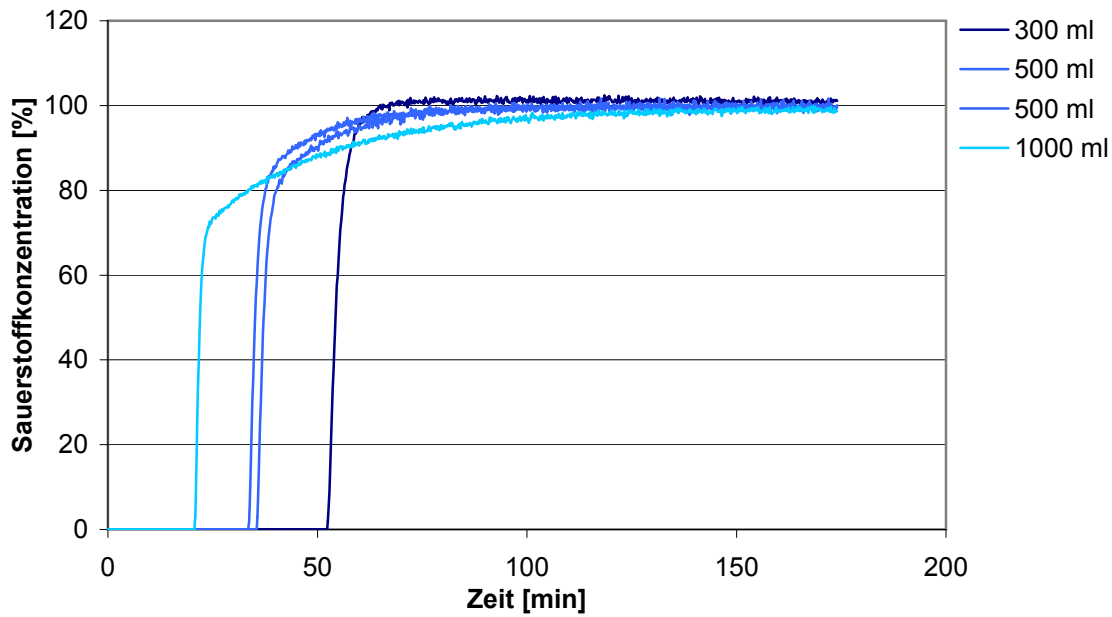


Abb. 4.12: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Sauerstoffkonzentration von Kolben mit 300 mL, 500 mL und 1000 mL mit je 100 mL Sulfitlösung bei 120 rpm Schüttelgeschwindigkeit

Nennvolumen	$t_1(50 \text{ mL})$ [min]	$t_1(100 \text{ mL})$ [min]	$t_1(200 \text{ mL})$ [min]	$\frac{50}{100}$	$\frac{50}{200}$	$\frac{100}{200}$
300 mL	21,99	52,49	124,78	0,419	0,176	0,420
500 mL	14,32	33,66	63,78	0,425	0,224	0,527
1000 mL	8,78	20,82	40,45	0,422	0,217	0,515

Tab. 4.4: Zusammenstellung der Zeiträume, die zur Sulfitoxidation bei Kolben mit einem Nennvolumen von 300 mL, 500 mL bzw. 1000 mL benötigt werden, sowie der Quotienten dieser Zeiträume aus Experimenten mit jeweils 120 rpm Drehzahl und den Füllvolumina 50 mL, 100 mL und 200 mL.

Bei den beiden anderen Kolben wird der $k_L a$ -Wert hier bei 100 mL Füllvolumen maximal. Maßgeblich wird der $k_L a$ -Wert von der Flüssigkeitsoberfläche beeinflusst. Wie aus Tabelle 4.4 hervorgeht, stehen die Zeiträume, die - bei unterschiedlichem Füllvolumen der Kolben - zur Sulfitoxidation benötigt werden, unabhängig vom Kolbennennvolumen in einem konstanten Verhältnis zueinander. Zu einer Abweichung kommt es, wenn der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffreservoir im Kolben derart überschreitet, dass eine diffusionkontrollierte Komponente in die Geschwindigkeit der Sulfitoxidation eingeht. Dies ist beim Kolben mit 300 mL Nennvolumen und 200 mL Füllvolumen der Fall. Effekte, die auf eine mangelnde Vermischung der Flüssigkeit zurückzuführen sind, sind von untergeordneter Bedeutung. Auch die Gasphase kann aufgrund der Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs in der Luft und der Durchmischung durch die Schüttelbewegung als homogen betrachtet werden. In Abbildung 4.11 auf Seite 40 ist darüber hinaus erkennbar, dass weder die t_{90} -Zeit noch der $k_L a$ -Wert allein zur

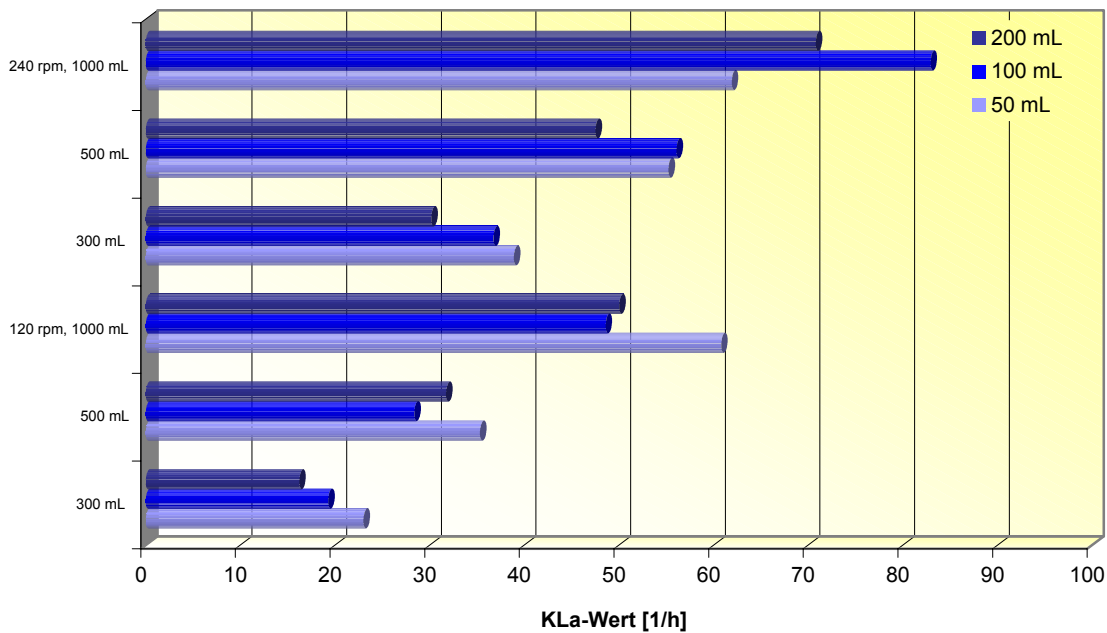


Abb. 4.13: Darstellung der $k_L a$ -Werte, die für die Kolben bei 2,5 cm Schüttelhub aus den Messwerten ermittelt wurden.

Charakterisierung des Sauerstoffeintrags ausreichend sind, da der Verlauf des Sauerstoffanstiegs so nicht berücksichtigt wird. Wie bereits in Kapitel 4.1.2.1 soll das Integral als Bezugsgröße verwendet werden. Aus Abbildung 4.14 auf der folgenden Seite geht hervor, dass der Einfluss der Drehzahl geringer ist als der von Kolbengröße und Füllvolumen. Betrachtet man die unterschiedlichen Kolben bei gleichen Bedingungen bezüglich Füllvolumen und Drehzahl, beschreiben die Integralsummen jeweils eine Gerade. Der Betrag der Steigung dieser Geraden steigt mit dem Füllvolumen. Das heißt, dass die Zeitspanne, innerhalb der die Gelöstsauerstoffkonzentration den Sättigungswert erreicht, wird, nachdem die Sulfitoxidation abgeschlossen ist, umso ähnlicher, je kleiner das Füllvolumen der Kolben ist.

Bei gleichen Kolben und unterschiedlichen Füllvolumina stehen die Integralsummen je nach Nennvolumen der Kolben in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander. Bei 300 mL Nennvolumen sinkt die Integralsumme bei steigendem Füllvolumen. Der größte Schritt ist zwischen 50 mL und 100 mL Füllvolumen zu beobachten. Berechnet man die im Kolben vorhandene Sauerstoffmenge, stellt man fest, dass bei 50 mL Füllvolumen der Sauerstoffbedarf für die Sulfitoxidation aus dem Gasvolumen des Kolbens gedeckt wird. Bei 100 mL Füllvolumen ist dies nicht mehr der Fall. Bei 500 mL Nennvolumen und 120 rpm sind die Integralsummen bei 50 mL und 100 mL etwa gleich groß, bei 240 rpm ist die Integralsumme bei 100 mL am größten. Bezieht man in die Betrachtung erneut den im Kolben zur Verfügung stehenden Sauerstoffgehalt bzw. den Sauerstoffbedarf mit ein, stellt man fest, dass der Sauerstoffbedarf bis 100 mL Füllvolumen aus dem Gasvolumen im Kolben gedeckt werden kann. Bei höherem

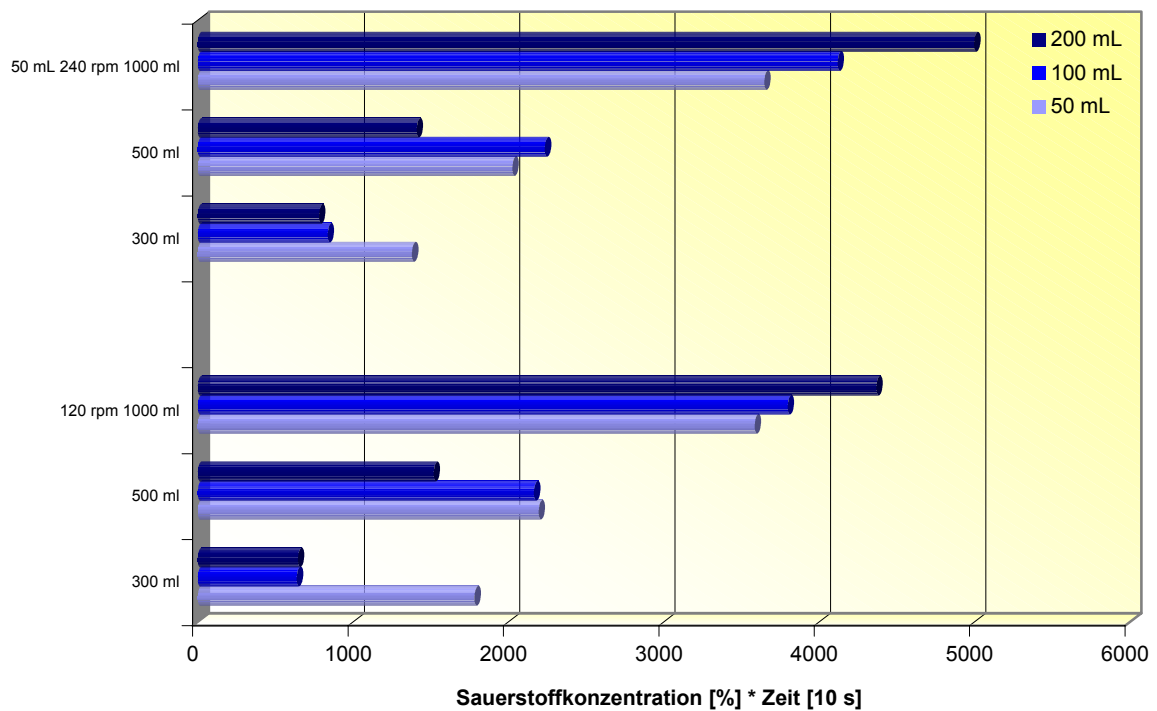


Abb. 4.14: Ergebnisse der Integralsummenbestimmung aus den Schüttelkolbenexperimenten mit unterschiedlichen Volumina in den Grenzen von t_0 bis $t_{(pO_2 = 95\%)}$, wie sie bereits im vorhergehenden Abschnitt angewendet wurde. Die Volumenangabe auf der y-Achse bezieht sich auf das Nennvolumen, die Angabe im Diagramm auf das Füllvolumen des Kolbens.

Füllvolumen nimmt die Integralsumme, wie in der vorangegangenen Messreihe beobachtet, ab. Bei 1000 mL Nennvolumen kann in allen Experimenten der Sauerstoffbedarf aus der Gasphase des Kolbens gedeckt werden. Die Integralsumme wächst mit zunehmendem Füllvolumen. Eine Variation des Kolbenverschlusses hat keine grundsätzliche Änderung auf den Verlauf des Anstiegs der Sauerstoffkonzentration zur Folge. Lediglich die Höhe des Konzentrationssprungs und die Reaktionsdauer ändern sich. In Abbildung 4.15 auf der folgenden Seite ist zu erkennen, dass der Zeitraum, der für die Sulfitoxidation benötigt wird, mit steigendem Nennvolumen des Kolbens sinkt, da die Sauerstoffmenge im Gasraum und die Flüssigkeitsoberfläche als Absorptionsfläche in gleicher Weise steigen. Die Steigung nach der Gleichgewichtseinstellung zwischen Gasphase und Flüssigkeit sowie die Höhe der Stufe bis zu dieser Gleichgewichtseinstellung nimmt mit abnehmendem Kolbennennvolumen zu. Ursache hierfür ist der jeweilige Sauerstoffgradient zwischen Umgebung und Gasraum des Kolbens, der ebenfalls mit zunehmendem Kolbenvolumen sinkt. Proportionalitäten zwischen den Kurvenverläufen bei Verwendung der Alukappe einerseits und Silikonkappe andererseits können nicht erkannt werden. Während beim 300 mL-Kolben sowohl die Zeitspanne, die für die Sulfitoxidation benötigt wird, als auch die Dauer, innerhalb der die Sauerstoffkonzentration im Kolben auf 100 % ansteigt, aufgrund des schlechteren Sauerstoffdurchgangs etwa den doppelten Wert gegenüber dem Ex-

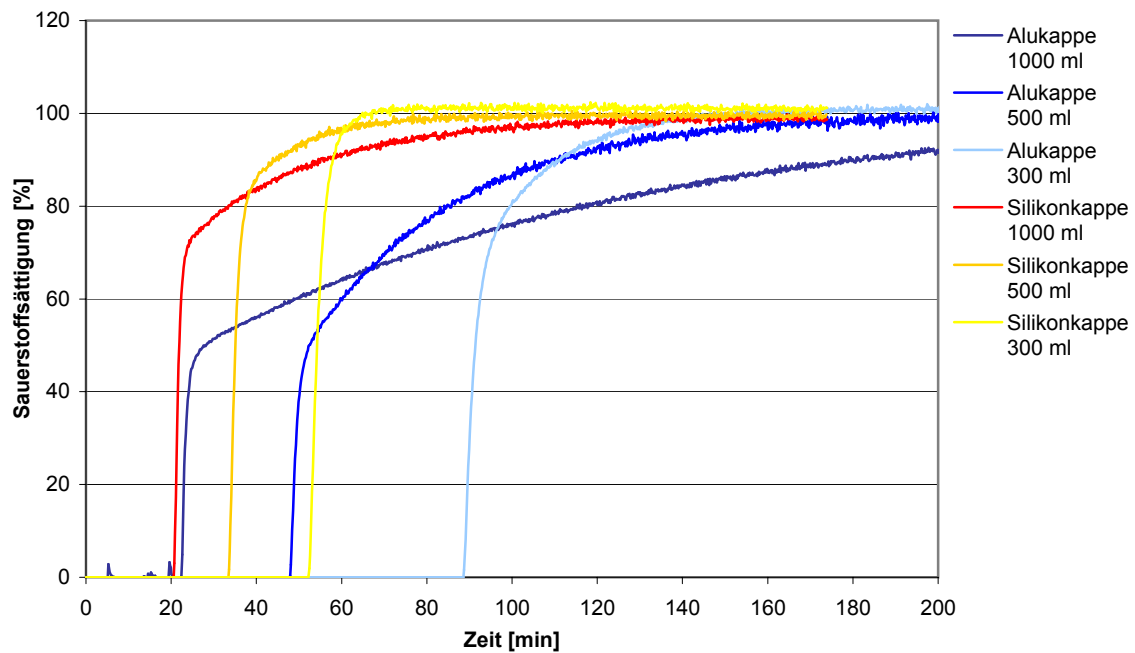


Abb. 4.15: Darstellung verschiedener Schüttelkolbenexperimente mit Kolben von 300 mL, 500 mL und 1000 mL Nennvolumen, jeweils mit 100 mL Reaktionslösung, 120 rpm Schüttelgeschwindigkeit, jedoch verschlossen mit Alukappen bzw. Silikonkappen.

periment mit Silikonkappe annimmt, wird die Reaktionsdauer beim 1000 mL-Kolben vom Kolbenverschluss nicht signifikant beeinflusst. Die Zeitspanne bis zur vollständigen Sauerstoffsättigung steigt etwa um den Faktor 4. Anhand von Abbildung 4.15 wird erneut deutlich, dass die Dauer der Sulfitreaktion und somit auch der ermittelte $k_L a$ -Wert keine eindeutige Auskunft über die Geschwindigkeit des Sauerstoffeintrags geben. Beschrieben wird hierdurch nur die Geschwindigkeit des Sauerstoffübergangs aus der Gasphase im Kolben in die flüssige Phase. Unberücksichtigt bleibt durch diesen Wert die Diffusion aus der Kolbumgebung bis zur Flüssigkeitsoberfläche.

4.1.2.2.2 Untersuchungen mit einer Amplitude von 5 cm Für die Experimente dieser Sektion wird ein Schüttelschrank Certomat BS1 der Fa. Sartorius mit einer Amplitude von 5 cm verwendet. Auch hier werden bei jedem Versuch je 2 Kolben mit 500 mL Nennvolumen parallel eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit des jeweiligen Versuchs beurteilen zu können. In diesem Kapitel wird wieder der $k_L a$ -Wert als Vergleichsgröße gewählt, da dieses Verfahren verbreiteter ist als die Bestimmung der Integralsumme. Darüber hinaus liegt die Veränderung gegenüber der Experimentreihe mit 2,5 cm Schüttelhub hier in einer Vergrößerung der Gasübergangsfläche durch die Erhöhung des Schüttelhubes. Der $k_L a$ -Wert erfasst diese Veränderung hinreichend und blendet die Effekte, die durch die unterschiedlichen Sauerstoffmengen im Kolben entstehen, aus.

Durch die größere Amplitude gegenüber den Versuchen im vorhergehenden Abschnitt kommt es bei gleicher Drehzahl zu einer Vergrößerung der Gasübergangsfläche, da die Flüssigkeit stärker an die Kolbenwandung gepresst wird.

$$F_{Flieh} = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{mit} \quad v = 2\pi r Z_{Umlauf} \quad \text{erhält man} \quad F_{Flieh} = m \cdot 4\pi^2 r Z_{Umlauf}^2 \quad (4.2)$$

Schüttelhub	r
Umläufe je Zeiteinheit	Z_{Umlauf}
Geschwindigkeit	v
Masse	m
F_{Flieh}	Fliehkraft

Die Ursache für die Erhöhung des Flüssigkeitspegels an der Kolbenwand ist die Fliehkraft, die nach der Formel 4.2 berechnet wird [53]. Daneben sind noch verschiedene andere Faktoren an der Einstellung des Flüssigkeitspegels beteiligt, wie Reibung zwischen Kolben und Flüssigkeit, innere Reibung der Flüssigkeit, Kolbengeometrie und Schwerkraft. Diese Faktoren werden im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet. Die Flüssigkeitsoberfläche, die als Größe für den Sauerstoffübergang relevant ist, ist aus den vorhandenen Daten nicht zugänglich. Die Form, die die Flüssigkeit im Kolben annimmt, wird bei niedriger Drehzahl durch einen schrägen Paraboloid, bei hoher Drehzahl durch eine Sichel beschrieben. Die Veränderung in der Höhe des Flüssigkeitspegels gibt somit lediglich einen Anhaltspunkt für die Veränderung der Flüssigkeitsoberfläche. Die Erhöhung des Flüssigkeitspegels nimmt mit dem Kolbennennvolumen zu. Zur Amplitude r des Schüttlers besteht ein linearer Zusammenhang. Zur Schüttelgeschwindigkeit, die durch die Anzahl der Umläufe eingeht, besteht ein quadratischer Zusammenhang. Der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf die Zentrifugalkraft und somit auf die Flüssigkeitsoberfläche ist größer als der Einfluss des Schüttelhubes. Eine Zusammenfassung der Daten befindet sich im Anhang A.4. Zu einem Einfluss des Schüttelhubes kommt es zumeist erst bei einer Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit auf 120 rpm. Der größte Effekt (Steigerung des Pegels um 25 %) tritt bei 100 mL Füllvolumen und einem Kolben mit 1000 mL Nennvolumen bei 240 rpm auf. Deutlicher als im selben Experiment mit 2,5 cm Schüttelhub ist zu erkennen, dass es für den Sauerstoffübergang, ein am $k_L a$ -Wert gemessenes Drehzahl abhängiges, optimales Füllvolumen gibt. Bei 120 rpm wird der $k_L a$ -Wert bei allen Kolben jeweils bei 50 mL maximal. Bei 240 rpm ist dies bei 100 mL Füllvolumen der Fall. Der Einfluss des Füllvolumens ist beim 1000 mL-Kolben und 240 rpm am größten. Hier ist der $k_L a$ -Wert mehr als doppelt so groß wie in den Experimenten mit 50 mL bzw. 200 mL. In Abbildung 4.17 auf der folgenden Seite sind die Quotienten der $k_L a$ -Werte aus den Experimenten mit 5 cm und 2,5 cm Schüttelhub zusammengestellt. Durch die Erhöhung des Schüttelhubes tritt grundsätzlich auch

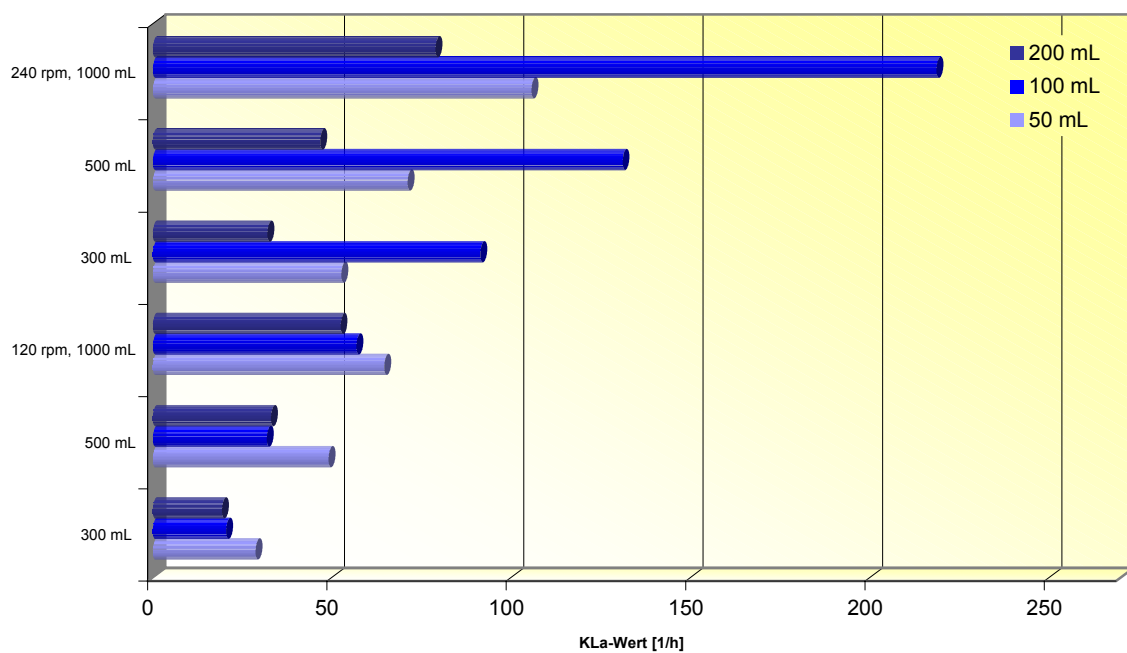


Abb. 4.16: Darstellung der k_{La} -Werte, die für die Kolben bei 5 cm Schüttelhub aus den Messwerten ermittelt wurden.

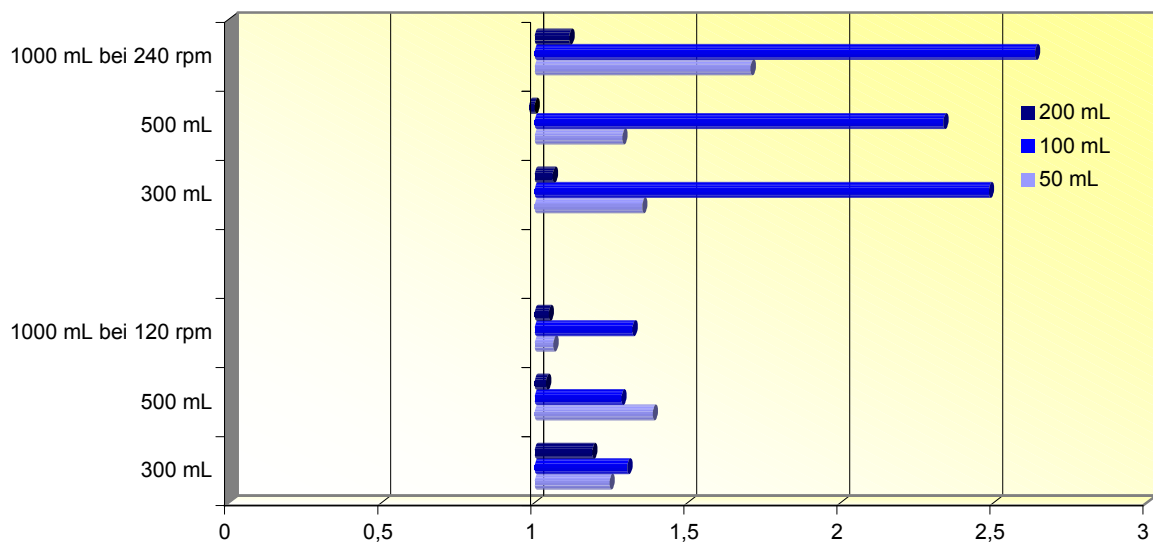


Abb. 4.17: Darstellung der Quotienten der k_{La} -Werte aus den Experimenten mit 5 cm und 2,5 cm Schüttelhub

eine Erhöhung des k_{La} -Werts ein. Bei 100 mL Füllvolumen kommt es, abgesehen von einer Ausnahme, zur stärksten Erhöhung des k_{La} -Werts durch die Vergrößerung des Schüttelhubs. In den meisten Fällen ist die Steigerung des k_{La} -Werts bei 240 rpm größer als bei 120 rpm, was auf den höheren Energieeintrag zurückzuführen ist.

4.1.2.3 Variation der Schikanenzahl

In diesem Abschnitt sind die Daten aus Experimenten zusammengefasst, bei denen der Sauerstoffeintrag durch Variation der Schikanen untersucht wurde. Alle Versuche dieser Sektion werden mit Alukappen als Kolbenverschluss durchgeführt. Es werden Glaskolben ohne Schikane, mit 2, 3 und 4 Schikanen und Polycarbonatkolben mit 4 Schikanen verwendet. Die Geometrie der Schikanen variiert. Direkt verglichen werden können nur die Glaskolben mit 2



Abb. 4.18: Abbildung der Kolben, die in dieser Sektion verwendet werden (v.l.n.r.) Polycarbonatkolben mit 4 Schikanen, Glaskolben mit 4, 3, 2 und ohne Schikanen. Die Schikanen des Polycarbonatkolbens sind in den Boden des Kolbens eingepresst. Beim Kolben mit 3 Schikanen sind diese mit geringerer Tiefe eingepreßt als bei den anderen Kolben. Zu erkennen sind auch die beiden Farbstoffpads am Boden jedes Kolbens.

und 4 Schikanen. Die Schikanen der anderen Kolben sind von geringerer Tiefe und beim Polycarbonatkolben (PC-Kolben) darüber hinaus in den Boden gepresst, statt in die Wandung, wie man in Abbildung 4.18 erkennt. Die Daten können aber trotzdem für die Bestimmung der Effizienz der Schikanen herangezogen werden. Neben der Anzahl der Schikanen werden Füllvolumen (50 mL, 100 mL und 200 mL) Schüttelgeschwindigkeit (60 rpm, 120 rpm, 180 rpm, 240 rpm und 320 rpm) und die Amplitude (2,5 cm und 5 cm) variiert. Ziel dieser Versuchsreihe ist zu ermitteln, wie groß der Einfluss der Schikanenanzahl auf den Sauerstoffeintrag ist. Die Temperatur wird bei allen Experimenten auf 30 °C eingestellt. Das Nennvolumen der Kolben beträgt jeweils 500 mL Als Kolbenverschlüsse wurden hier Alukappen gewählt, da diese unempfindlicher gegen Spritzwasser sind als die Silikonkappen. Bei hoher Drehzahl (>240 rpm)

kommt es trotzdem mehrfach zu einer Beeinflussung der Messung durch Spritzwasser, das über den Spalt zwischen Kappe und Kolbenwand aus dem Kolben austritt.

4.1.2.3.1 Untersuchungen mit einer Amplitude von 2,5 cm Zunächst sollen nur die Versuche betrachtet werden, die mit 2,5 cm Schüttelhub durchgeführt werden. Hierfür wird ein Certomat M mit Inkubationshaube Certomat H, Fa Sartorius, verwendet. Wie in

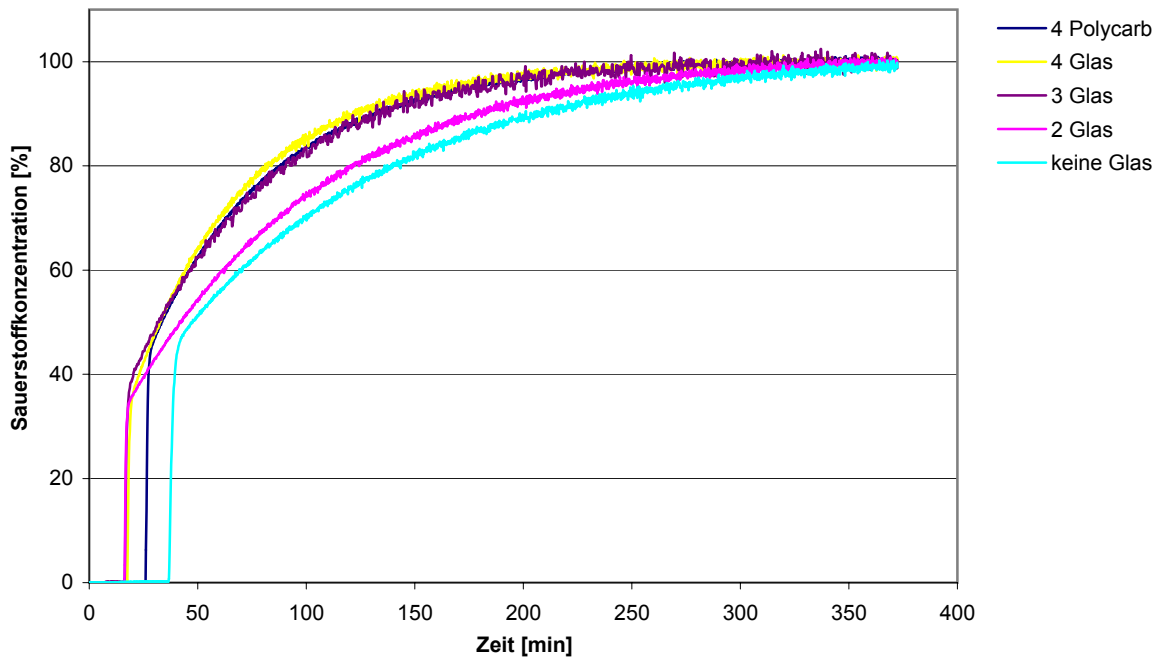


Abb. 4.19: Abbildung der Daten aus einer Messung, die mit 120 rpm bei 100 mL Füllvolumen durchgeführt wurde. Die Zahlen in der Legende bezeichnen die Anzahl der Schikanen

Abbildung 4.19 zu erkennen ist, ähneln sich die Messkurven der verschiedenen Kolben stärker als in den voran gegangenen Experimentreihen. In guter Näherung sind, aufgrund der gleichen Kolbengröße, des gleichen Kolbenverschlusses und der gleichen Sulfitmenge, Sauerstoffmenge, Diffusionshemmung und Sauerstoffbedarf in allen Kolben gleich. Eine Varianz des Sauerstoffeintrags resultiert ausschließlich aus der Veränderung der Gasübergangsfläche durch Blasenbildung an den Schikanen. Der Effekt, der durch die unterschiedlichen Benetzungseigenschaften von Glas und Polycarbonat entsteht und die Varianz des Sauerstoffeintrags in den Kolben aufgrund der unterschiedlichen Breiten des Spaltes zwischen den Kolben und den Alukappen wird in dieser Betrachtung vernachlässigt. Die Sauerstoffübergangsfläche als geschwindigkeitsbestimmender Parameter ist unter den vorliegenden Bedingungen durch die Reaktionsdauer und somit durch den $k_L a$ -Wert hinreichend erfasst.

Aufgrund der Zunahme der eingetragenen Energie je Volumenelement, steigt der $k_L a$ -Wert eines Kolbens mit zunehmender Schüttelfrequenz und abnehmendem Volumen. Eine einfache Aussage über die Wirkung der Schikanen auf den Sauerstoffeintrag ist nicht möglich. Bei

200 mL Füllvolumen und gleicher Drehzahl sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kolben nur gering, wie aus Abbildung 4.20 zu entnehmen ist. Bei 60 rpm sind die k_La -Werte

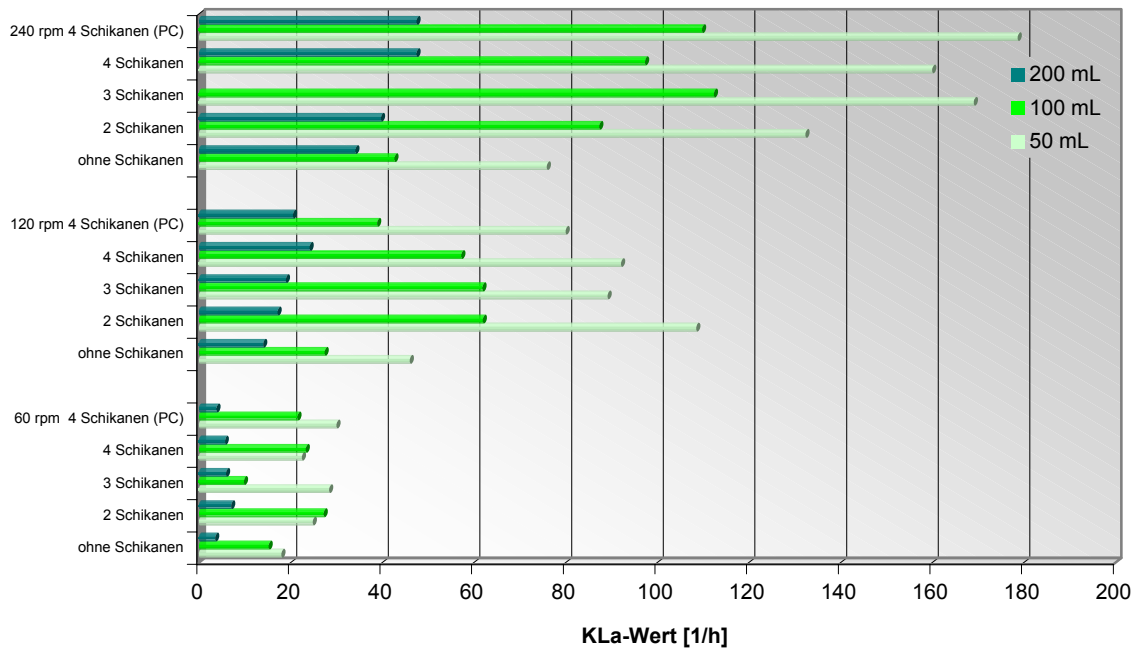


Abb. 4.20: Zusammenfassung k_La -Werte, die aus den Messungen mit den Schikanekolben nach der statischen Methode bestimmt wurden

des Kolbens ohne Schikane und des PC-Kolbens mit 4 Schikanen annähernd gleich. Bei dieser geringen Drehzahl kommt es bei den Kolben, bei denen die Schikanen in die Seitenwand eingepreßt sind, gegenüber dem Kolben ohne Schikanen zu einem leichten Anstieg des Sauerstoffeintrags. Die Ursache für diesen Unterschied liegt in den verschiedenen Strömungen im Kolben. Während es bei den Kolben, deren Schikanen in die Seite eingepreßt sind, zur Ausbildung von Wirbeln an der Flüssigkeitsoberfläche und zu einer Vergrößerung der Sauerstoffübergangsfläche kommt, sind Wirbel an den Schikanen des PC-Kolbens bei dieser Drehzahl nicht erkennbar. Die Flüssigkeitsoberfläche bleibt nahezu unverändert, da das Schwappen der Flüssigkeit durch die Schikanen im Kolbenboden abgebremst wird.

Bei 100 mL Füllvolumen und einer Drehzahl von 60 rpm kann ein Abbremsen des Schwappens beim Kolben mit 3 Schikanen beobachtet werden. Bei höherer Drehzahl ist der Sauerstoffeintrag bei diesem Kolben am stärksten. Bei 120 rpm ist der Sauerstoffeintrag bei den Glaskolben mit 2 und 4 Schikanen etwa genauso groß, wie beim Kolben mit 3 Schikanen. Bei 50 mL Füllvolumen und 120 rpm kommt es beim Kolben mit zwei Schikanen zum höchsten Sauerstoffeintrag. Bei 240 rpm wird bei den Kolben mit den flachen Schikanen der höchste Sauerstoffeintrag erzielt. Der höchste Sauerstoffeintrag dieser Versuchsreihe wird beim PC-Kolben bei 240 rpm und 50 mL Füllvolumen erreicht. In Abbildung 4.21 auf der folgenden Seite sind die k_La -Werte aus Experimenten mit 100 mL Füllvolumen bei Drehzahlen von 60 rpm bis 320 rpm zusam-

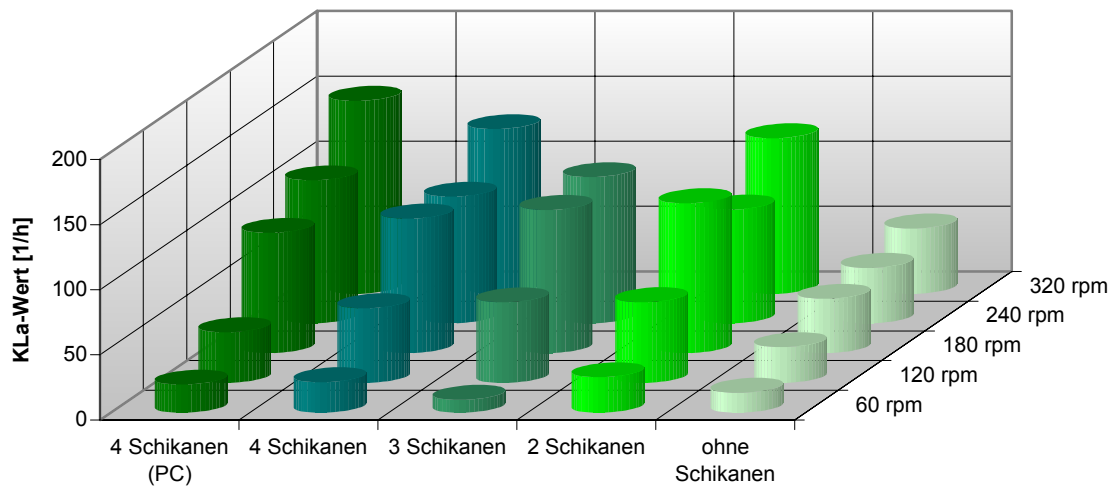


Abb. 4.21: Übersicht der k_La -Werte bei 100 mL Füllvolumen und einer Variation der Schüttlerdrehzahl von 60 - 320 rpm

mengestellt. Der k_La -Wert steigt mit der Drehzahl bei den Kolben ohne Schikane und beim PC-Kolben stetig. Bei den Kolben mit 2 und 4 Schikanen liegen die k_La -Werte bei 240 rpm unterhalb derer von 180 rpm. Beim Kolben mit 3 Schikanen ist der k_La -Wert-Anstieg bei der Drehzahlsteigerung von 180 rpm auf 240 rpm nur gering. Die Ursache hierfür ist in Unterschieden bei der Strömung in den Kolben zu suchen. Während die Flüssigkeit im Kolben ohne Schikanen und im PC-Kolben unabhängig von der Drehzahl zirkulieren kann, wird der Einfluss des Strömungswiderstands an den seitlich eingepprägten Schikanen immer größer. Beim Kolben ohne Schikanen vergrößert sich die Oberfläche der Flüssigkeitssichel stetig. Durch die in den Boden eingepprägten Schikanen beim PC-Kolben kommt es beim Überströmen ab 120 rpm zum Eintrag kleiner Blasen. Bei einer Steigerung der Drehzahl erhöht sich die Anzahl der Blasen. Bei den Kolben mit seitlich eingepprägten Schikanen kommt es zum Eintrag größerer Luftblasen, die jedoch eine geringe Gasübergangsfläche generieren. Gleichzeitig kommt es zur Bildung von Spritzern, die die Gasübergangsfläche vergrößern.

4.1.2.3.2 Untersuchungen mit einer Amplitude von 5 cm Wie bereits in der Sektion 4.1.2.2 soll auch hier der Einfluss des Schüttelhubs auf den Sauerstoffeintrag bestimmt werden. Die Experimente werden in einem Inkubator Certomat BS 1 mit 5 cm Schüttelhub durchgeführt. Abgesehen von dieser Modifikation sind alle Versuchsparameter identisch mit denen des vorher gehenden Abschnitts. Am grundsätzlichen Verlauf der Kurven des Gelöstsauerstoffgehalts ändert sich gegenüber den Experimenten mit 2,5 cm Schüttelhub nichts. Vergleicht man die k_La -Werte in Abbildung 4.20 auf der vorigen Seite und Abbildung 4.22 auf der folgenden Seite, erkennt man bei der Versuchsreihe mit 200 mL Füllvolumen sowohl bei 60 rpm, als auch bei 120 rpm nahezu identische Verhältnisse der k_La -Werte untereinander-

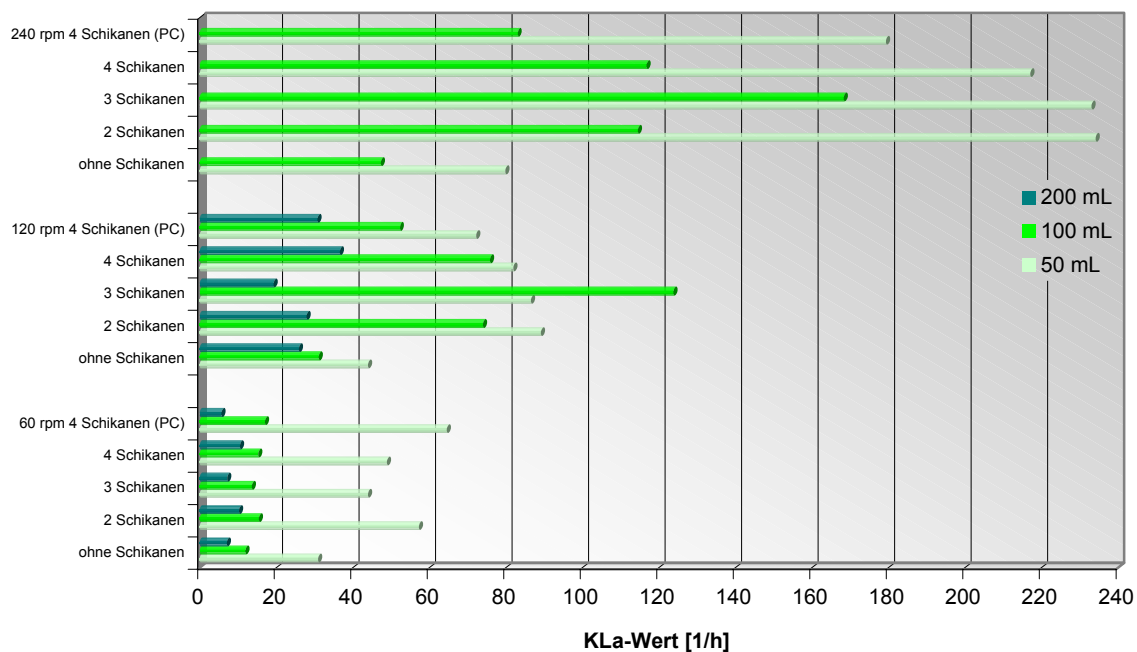


Abb. 4.22: Übersicht über die $k_L a$ -Werte bei großem Schüttelhub und 60 rpm, 120 rpm und 240 rpm, mit 50 mL, 100 mL und 200 mL Füllvolumen. Bei 240 rpm konnte die Messung mit 200 mL Füllvolumen nicht durchgeführt werden, da aus mehreren Kolben massiv Flüssigkeit ausgetragen wurde.

der. Die $k_L a$ -Werte steigen durch die Erhöhung des Schüttelhubes um einen Faktor von 1,4 - 2. Lediglich beim Kolben mit 3 Schikanen weist der $k_L a$ -Wert ein abweichendes Verhalten auf. Der $k_L a$ -Wert steigt hier nur um einen Faktor von 1,2 bzw. 1,01. In den Experimenten mit 100 mL Füllvolumen bei 60 rpm kommt es bei erhöhtem Schüttelhub zu einer Verringerung des $k_L a$ -Werts. Eine Ausnahme bildet wieder der Kolben mit 3 Schikanen. Hier kommt es zu einem Anstieg des $k_L a$ -Werts um den Faktor 1,4. Wird bei gleich bleibendem Volumen die Schüttelgeschwindigkeit verdoppelt, kommt es, verglichen mit den Daten in Abbildung 4.20 auf Seite 50, zu einer Erhöhung des Sauerstoffeintrags. Dies ist beim Kolben mit 3 Schikanen besonders stark ausgeprägt. Die Steigerung erfolgt hier um einen Faktor 2, bei den anderen Kolben liegt der Faktor zwischen 1,1 und 1,3. Bei der Erhöhung der Drehzahl auf 240 rpm kommt es zu einem proportionalen Anstieg des $k_L a$ -Werts, lediglich beim Polycarbonatkolben sinkt der $k_L a$ -Wert ab. Bei 50 mL Volumen wird der Unterschied zwischen 2,5 cm und 5 cm Schüttelhub am deutlichsten. Es kommt zu einem Anstieg des $k_L a$ -Werts um einen Faktor von 1,5 - 2,3. Auch bei 240 rpm ruft die Erhöhung des Schüttelhubes einen deutlichen Effekt hervor (Faktor 1,03 bis 1,77). Bei 5 cm Schüttelhub wird eine Veränderung des $k_L a$ -Werts durch die Geometrie der Schikanen dominiert. Eine Übersicht über die Veränderung der $k_L a$ -Werte bei Veränderung des Schüttelhubes ist Abbildung 4.23 auf der folgenden Seite zu entnehmen. Auf den ersten Blick ist ein Trend zu erkennen, dass der Einfluss der Amplitude auf den $k_L a$ -Werte

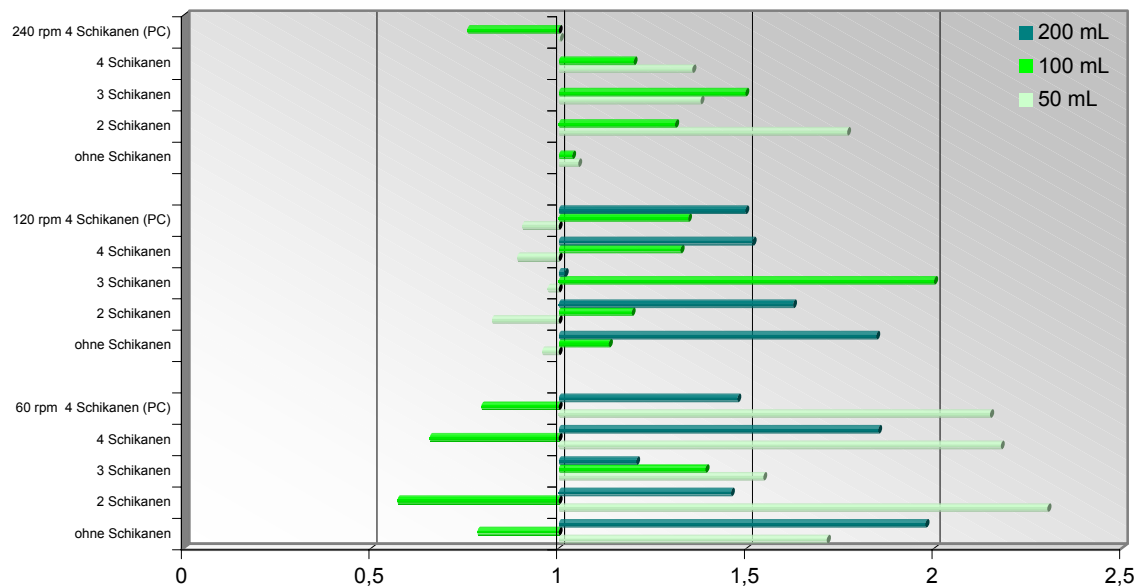


Abb. 4.23: Graphischer Überblick über die Quotienten der $k_L a$ -Werte aus den Versuchsreihen mit großem und kleinem Schüttelhub.

mit sinkender Schüttelgeschwindigkeit steigt.

Wie bereits in der Experimentreihe mit 2,5 cm Schüttelhub soll auch bei 5 cm Schüttelhub das Verhalten der Kolben mit 100 mL Füllvolumen genauer untersucht werden. Betrachtet

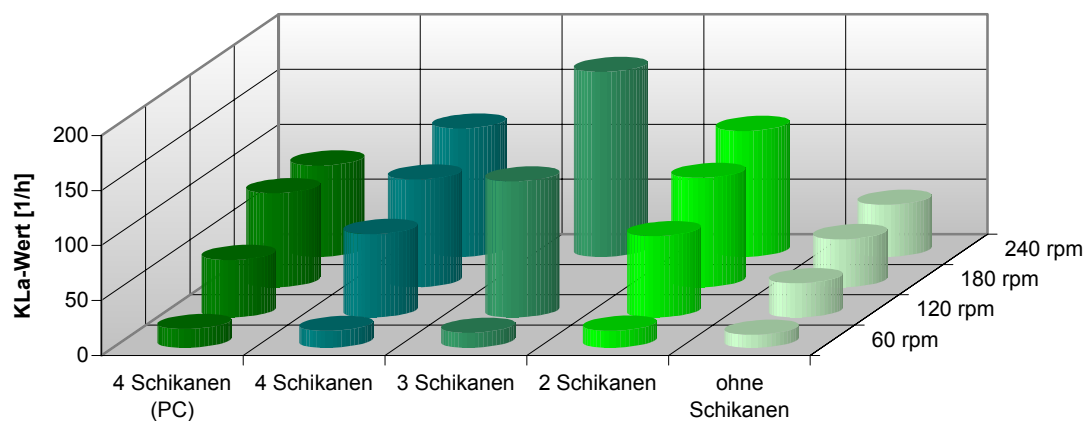


Abb. 4.24: Zusammenfassung der $k_L a$ -Werte, die mit einem Füllvolumen von 100 mL, bei 60 rpm, 120 rpm, 180 rpm und 240 rpm bestimmt wurden.

man die Zusammenfassung der Daten in Abbildung 4.24 und vergleicht sie mit der Darstellung in Abbildung 4.21 auf Seite 51, sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Im Gegensatz zu den Verläufen des $k_L a$ -Werts bei 2,5 cm Schüttelhub, erhält man bei 5 cm Schüttelhub einen stetigen Anstieg des $k_L a$ -Werts mit dem Anstieg der Drehzahl. Daneben erhält man hier bei der Verwendung des Kolbens mit 3 Schikanen oberhalb von 60 rpm den höchsten

Sauerstoffeintrag. Bei 2,5 cm Schüttelhub wird der höchste Sauerstoffeintrag durch die Glaskolben mit 2 und 4 Schikanen bzw. bei 320 rpm durch den Kolben aus Polycarbonat generiert. Durch die Verdopplung der Amplitude kommt es bei 60 rpm und 180 rpm in allen Kolben, abgesehen vom Glaskolben mit 3 Schikanen, zu einer Verringerung des Sauerstoffeintrags. Bei einer Erhöhung der Drehzahl auf 120 rpm tritt bei allen Kolben, bei 240 rpm bei allen Glaskolben, eine Erhöhung des Sauerstoffeintrags ein. Die fehlende Stetigkeit in der Veränderung des Sauerstoffeintrags bei Verdopplung der Amplitude deutet auf komplexe Veränderungen der Strömungsverhältnisse und der Dispersion, basierend auf dem erhöhten Energieeintrag, hin. Die erhöhte Fliehkraft führt zu einer Erhöhung des Flüssigkeitspegels am Rand des Kolbens. Aufgrund der tiefen Schikanen kommt es bei den Glaskolben mit 2 und 4 Schikanen zu erheblichen Störungen der Strömung. Die flacheren Schikanen des Kolbens mit drei Schikanen tauchen bei Erhöhung der Amplitude tiefer in die Flüssigkeit ein, wodurch ihre Effektivität steigt. Beim Polycarbonatkolben kommt es zu einer Umkehrung dieses Effekts, da die Schikanen im Boden eingepreßt sind. Die Schichtdicke im Zentrum des Bodens sinkt, die Fläche, in der es zu einem effektiven Einbringen von Blasen kommt, verringert sich.

4.1.2.4 Fazit

Die Einflüsse auf Sauerstoffeintrag und Geschwindigkeit der Sulfitoxidation sind vielfältig. Von großer Bedeutung ist der Kolbenverschluss. Durch den Kolbenverschluss kommt es zu einem Einfluss auf den Sauerstoffeintrag, der nicht hinreichend durch den $k_L a$ -Wert erfasst wird. Abhängig vom Gasvolumen und der eingesetzten Sulfitmenge kommt es zur vollständigen Sulfitoxidation, allein beeinflusst durch die Gasaustauschfläche. Ein Einfluss des Sauerstoffübergangs aus der Umgebung in den Kolben kann bei relativ großem Gasvolumen nicht beobachtet werden. Eine Größe, die die Sauerstoffdurchlässigkeit durch den Kolbenverschluss beschreibt, kann mit Hilfe einer numerischen Integration der Messdaten von $t = 0$ bis $t(pO_2=95\%)$ bestimmt werden. Eine hohe Integralsumme deutet auf geringen Sauerstoffdurchgang hin. In den Experimenten wurde festgestellt, dass bewährte Verschlussysteme wie Watte oder Zellstoff einen hohen Sauerstoffdurchgang gewährleisten, während Alukappen, die häufig aufgrund ihrer Robustheit und einfachen Handhabung verwendet werden, eine deutlich geringere Sauerstoffdurchlässigkeit aufweisen. Andere Systeme, wie der Bugstopper, wiesen neben geringer Sauerstoffdurchlässigkeit weitere Schwachpunkte auf: durch die Rotationsbewegung wird der Bugstopper mit kinetischer Energie beaufschlagt und löste sich aus dem Kolben. Eine sichere Kultivierung ist nur durch Verkleben des Stopfens möglich. Andere wichtige Aspekte des Kolbenverschlusses, wie beispielsweise Sterilsicherheit, Handhabung, Reproduzierbarkeit oder Kosten je Experiment werden im Rahmen dieser Arbeit nicht bewertet. Bei einem idealen Kolbenverschluss, der die gleiche Durchlässigkeit für Sauerstoff hat wie der offene Kolben, könnte die Bewertung des Sauerstoffeintrags bei Variation von Kolbenvolumen und der Schi-

kanenanzahl anhand des k_La -Werts erfolgen.

Eine weitere relevante Größe für den Sauerstoffeintrag ist das Volumen des Kolbens. Bei der Variation der Kolbengröße treten zwei einander entgegen wirkende Effekte auf. Durch die Vergrößerung des Kolbenvolumens bei gleich bleibender Flüssigkeitsmenge kommt es zu einer Vergrößerung der Gasaustauschfläche und zu einer Steigerung des k_La -Werts. Das vergrößerte Gasvolumen im Kolben verstärkt diesen Effekt zunächst. Die Zeitspanne, bis der Gelöstsauerstoffgehalt wieder den Ausgangszustand von 100 % erreicht, steigt jedoch ebenfalls mit dem Kolbenvolumen, da der Sauerstoffgradient zwischen dem Gasraum im Kolben und der Umgebung, die Triebkraft des Sauerstoffaustausches, sinkt. Darüber hinaus steigt die Diffusionsstrecke im Kolben. Welche Größe für die Bewertung des Sauerstoffeintrags herangezogen wird hängt vom Prozess ab, der im Kolben durchgeführt werden soll. Betrachtet man den Sauerstoffeintrag nur anhand des k_La -Werts, erzielt man bei 120 rpm den höchsten Sauerstoffeintrag bei der Verwendung von 50 mL Flüssigkeit, bei 240 rpm durch die Verwendung von 100 mL Flüssigkeit. Diese Betrachtung kann angewendet werden, wenn der Sauerstoffbedarf im Kolben vollständig durch den im Gasraum enthaltenen Sauerstoff gedeckt wird.

Durch den Einsatz von Kolben mit Schikanen kann der Sauerstoffeintrag erhöht werden. Geschieht die Auswahl von Art und Anzahl der Schikanen nicht sorgfältig, ist auch eine Abnahme des Sauerstoffeintrags möglich. Entscheidender als die Anzahl der Schikanen ist deren Geometrie. Bei niedriger Drehzahl kommt es bei Schikanen, die eine große Wirtiefe haben, zum höchsten Sauerstoffeintrag. Bei hoher Drehzahl erzeugen flache Schikanen den höchsten Sauerstoffeintrag. Als Parameter für den Sauerstoffeintrag wurde der k_La -Wert gewählt, da die einzige Variable des Systems, die Gasaustauschfläche, hierdurch hinreichend beschrieben wird. Anhand von Abbildung 4.25 auf der folgenden Seite ist ein Vergleich der k_La -Werte aus den Experimenten mit Schikanen und mit Volumenvariation möglich. Bei den Glaskolben tritt durch die Schikanen eine Vergrößerung des k_La -Werts auf, der durch eine Verdopplung des Kolbennennvolumens nicht erreicht werden kann. Die Verstärkung des Sauerstoffeintrags durch die Erhöhung des Schüttelhubs nimmt mit steigendem Kolbenvolumen ab. Bei den Schikanekolben kommt es zum Anstieg des k_La -Werts um einen Faktor 1,2 - 1,3. Eine Ausnahme bildet der Kolben mit 3 Schikanen. Der k_La -Wert verdoppelt sich hier durch die Erhöhung der Amplitude. Zu einem vergleichbaren Sauerstoffeintrag kommt es beim 1000 mL Kolben bei 5 cm Schüttelhub und den Kolben mit 2 bzw. 4 Schikanen bei 2,5 cm Schüttelhub. Um hier zu einer eindeutigen Bewertung zu gelangen, ist es notwendig, reale Systeme zu beobachten. Zu einer Einflussnahme auf den Sauerstoffeintrag kann es dann auch durch oberflächenaktive Substanzen, Viskosität und Schaumbildung kommen.

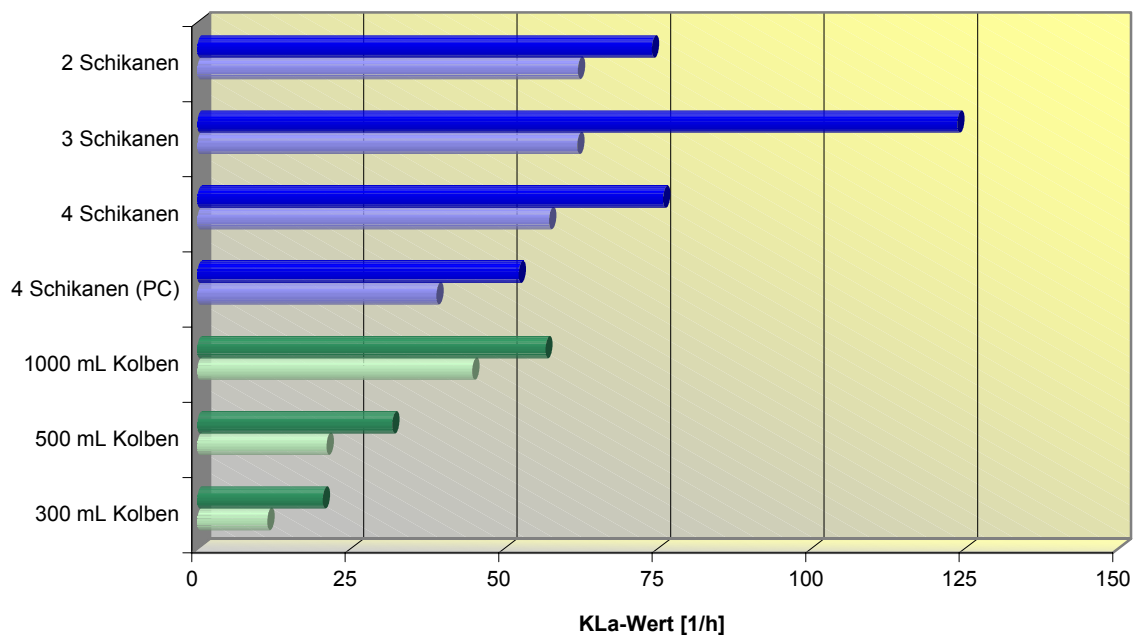


Abb. 4.25: Darstellung von $k_L a$ -Werten, die aus den Daten von vier Messreihen mit Kolben unterschiedlichen Volumens und unterschiedlicher Schikanenanzahl bestimmt wurden. Als Kolbenverschluss wurden jeweils Alukappen verwendet. Der dunklere Zylinder stellt den Wert dar, der bei 5 cm Schüttelhub bestimmt wurde, der hellere Zylinder gibt den Wert aus den Messreihen mit 2,5 cm Schüttelhub an.

4.1.2.5 Auswahl des Kolbenmaterials

Als Kolbenmaterial kommen Glas und verschiedene Kunststoffe (untersucht wurden Polycarbonat (PC), Polymethylpentan (PMP) und Polypropylen (PP)) in Betracht. Glas bietet die Vorteile Hitzebeständigkeit, chemische Beständigkeit, Formstabilität und Kratzfestigkeit. Kunststoffe sind in ihrer Form leicht modifizierbar, haben ein geringeres Gewicht und sind stoßfest. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Materialien aufgrund ihrer Transparenz geeignet sind, um sie für Messkolben zu verwenden, und ob durch die Sterilisation mit Heißdampf bei 121 °C negative Veränderungen an den Kolben auftreten. Dies war auch nach 25 Autoklaviervorgängen à 20 min nicht der Fall. Der Kolben aus PMP wurde durch das Autoklavieren sogar transparenter. Eine Eintrübung des PC, wie in der Produktbeschreibungen angegeben, wurde nicht beobachtet. Lediglich bei den Schikanekolben aus Polycarbonat löste sich in zwei Fällen das Farbstoffpad vom Kolbenboden. Ob dies eine materialspezifische Eigenschaft ist, oder aufgrund von Abweichungen in der Fertigung geschah, konnte nicht ermittelt werden. Der Einfluss von Materialtrübung auf die Intensität des Messsignals, wie beispielsweise bei PP, ist gering. Problematisch ist die Handhabung der Kunststoffkolben. Insbesondere durch mechanische Belastung der Kolben aus PP und PMP bei hoher Temperatur (> 100 °C), wie beispielsweise bei der Entnahme der Kolben aus dem Autoklaven, kann es zu irreversiblen

Verformungen der Kolben kommen. Der Sauerstoffeintrag kann hierdurch varriieren. Aufgrund der geringen Plastizität des Materials und der mit Glas vergleichbaren Farb- und Lichtstreuungseigenschaften erscheint Polycarbonat als am besten geeignetes Material.

Das Material des Farbstoffpads wird durch das Autoklavieren nicht negativ beeinflusst. Vor dem ersten Gebrauch des Kolben ist es jedoch notwendig, die Kolben auf über 130 °C zu erhitzen. Da das Messsystem vor der Sterilisation des Kolbens kalibriert wird, kommt es ansonsten durch das Autoklavieren zu einer Veränderung des Farbstoffes, die die Daten der Messung verfälscht. Statt 100 % Sauerstoffgehalt können dann Werte bis 120 % erreicht werden. Alternativ können Kolben auch fünf mal bei 121 °C autoklaviert werden, um diesen Effekt weitgehend zu unterbinden. Nach weiteren 10 Autoklavierprozeduren betrug die Abweichung unter 2 %. Danach wurde keine Abweichung mehr festgestellt, die auf die Hitzeeinwirkung zurückzuführen ist. Durch das Autoklavieren kommt es zu einer Abnahme der Signalintensität, was eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses zur Folge haben kann. Die Abnahme der Signalintensität beträgt bei Glas 6,5 %, bei PC 21,8 %, bei PMP 3,0 % und bei PP 9,5 %. Aufgrund dieser Tatsache hat es sich bewährt, nur identisch behandelte Kolben zu verwenden, um bei einer Verwechslung der Kolben noch schlüssige Daten erhalten zu können und eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Auch das Vertauschen von Kolben unterschiedlicher Materialien untereinander führt zu Fehlmessungen. Tauscht man, nach einer Kalibration mit Glaskolben, diese gegen Kolben aus anderem Materialien aus, erhält man im Zustand der Sauerstoffsättigung eine Abweichung des Messwertes. Beim Kolben aus PMP kommt es zu einer Erhöhung um 12 %. Bei PC und PP kommt es zu einer Verringerung des Wertes um 7 % bzw. 12,5 %.

4.1.2.6 Positionierung des Farbstoffpads

Die Positionierung des Farbstoffpads hat sich, besonders bei den Messungen mit 5 cm Schüttelhub und hoher Schüttelgeschwindigkeit, als wichtiger Faktor herausgestellt. Durch die Fliehkraft wird die Flüssigkeit an die Wandung gepresst, wobei an der Kolbenseite, die der Rotorachse jeweils abgewandt ist, ein Flüssigkeitsberg entsteht. Entlang der Kolbenwand entsteht eine fast geschlossene, sichelförmige Flüssigkeitsfläche. An der Kolbenwand entlang befindet sich fast kontinuierlich Flüssigkeit, unabhängig von der Drehzahl des Schüttlers. Die Kolbenmitte kann unter bestimmten Voraussetzungen frei liegen. Dies ist das Resultat zweier Fliehkräfte, die aufgrund der Rotationsbewegung auftreten. Es wirkt die Fliehkraft, die aufgrund der Rotationsbewegung des Schüttlers entsteht und die Flüssigkeit auf die Seite des Kolbens bewegt, die der Rotatorachse des Schüttlers abgewandt ist. Hinzu kommt die Fliehkraft, die aus der Rotation der Flüssigkeit im Kolben resultiert und diese aus der Kolbenmitte an die Kolbenwand schiebt. Bei dem Experiment, dessen Messwerte in Abbildung 4.26 auf der folgenden Seite dargestellt sind, kommt es durch die Summe der Fliehkräfte zu einer nahezu

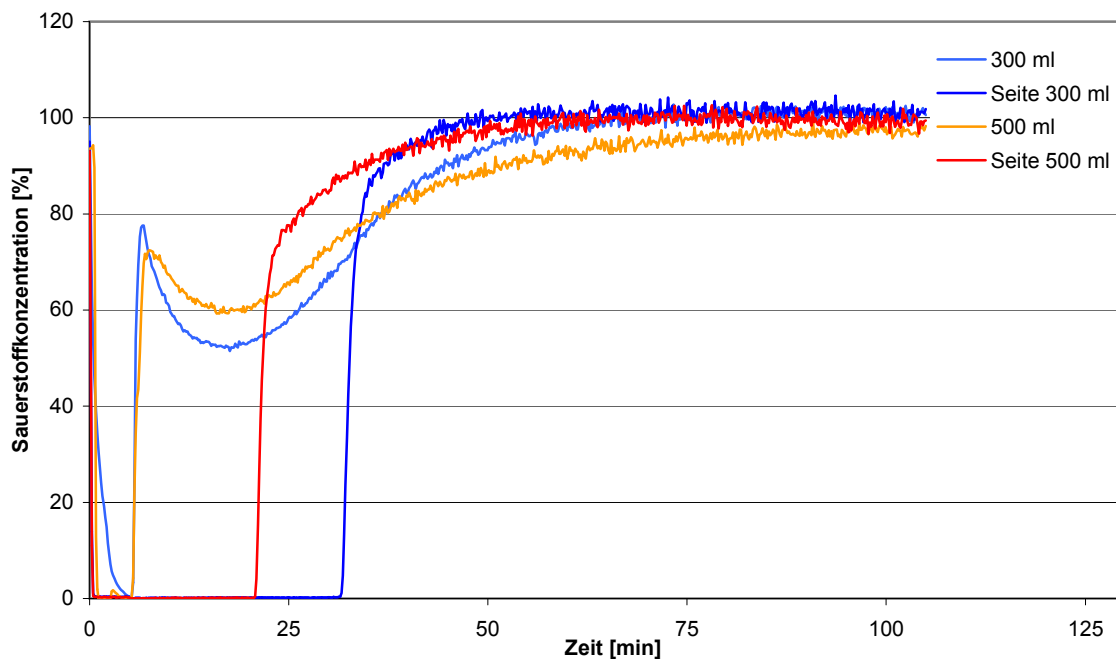


Abb. 4.26: Daten eines Experiments, die bei 5 cm Schüttelhub, 300 rpm, 100 mL Sulfitlösung mit Kolben von 300 mL, und 500 mL aufgenommen wurden. In den jeweiligen Messreihen, die die Bezeichnung „Seite“ tragen wurden Farbstoffpads bemessen, die sich am Rand des Kolbenbodens befinden. Bei den beiden anderen Messungen wurde das Pad in der Mitte bemessen.

vollständigen Verdrängung der Flüssigkeit aus dem Zentrum des Kolbens. Freigelegt wird das Farbstoffpad nur bei Drehzahlen oberhalb von 280 rpm, 5 cm Schüttelhub und den Kolben mit 300 mL und 500 mL Nennvolumen. Da die Fliehkraftkomponente, die aufgrund der Zirkulation der Flüssigkeit im Kolben auftritt, nicht direkt von der Amplitude des Schüttlers abhängig ist - sie wird im Wesentlichen durch die Schüttelfrequenz und die damit verbundene Rotationsgeschwindigkeit der Flüssigkeit im Kolben beeinflusst - ist die Fliehkraft, die durch die Exzenterbewegung des Schüttlers entsteht und nach der Formel 4.2 auf Seite 46 bestimmt wird, die maßgebliche Größe für das Freilegen des Pads. Da die bewegte Masse ein Fluid ist, ist die Betrachtung der Bewegung aufwändig. Es handelt sich nicht um einen Massepunkt, sondern um einen Körper, der sich unter der Einwirkung von Fliehkraft, Reibung, Gravitation und dem Widerstand der Kolbenoberfläche stetig verformt. Die Krafteinwirkung auf ein Fluidelement erfolgt nicht stetig, sondern abhängig von der Lage des Elements. Bei den Fluidelementen, die in Kontakt mit der Kolbenoberfläche stehen, kommt es zum Einwirken von Reibungskräften. Wirkt keine weitere Kraft, bleiben diese Fluidelemente -relativ zum Kolben- unbewegt. Die Bedeutung der Reibung steigt mit der Abnahme der Dicke des Flüssigkeitsfilms. Vergleicht man Kolben mit gleichem Füllvolumen, nimmt die Schichtdicke der Flüssigkeit mit steigendem Nennvolumen ab. Die Kontaktfläche zwischen Flüssigkeit und

Kolben wird relativ zum Volumen der Flüssigkeit erhöht. Hinzu kommt, dass die relative Kolbengrundfläche, die bei der Schüttelbewegung von der Kolbenwand überstrichen wird, mit steigendem Kolbenvolumen abnimmt. Dies führt dazu, dass bei steigendem Kolbenvolumen eine größere Flüssigkeitsschicht in der Kolbenmitte durch die steigende Wirkung der Reibung lokalisiert bleibt. Gleichzeitig sinkt die Krafteinwirkung auf diese Elemente, da die Entfernung zu den Kolbenwänden zunimmt. Über die Auslenkung des Masseschwerpunktes in Abhängigkeit von der Amplitude des Schüttlers entsteht ein indirekter Einfluss der Amplitude auf die Fliehkraftkomponente, die aus der Eigenrotation der Flüssigkeit resultiert. Dies begünstigt das Freilegen der Kolbenmitte. Der entscheidende Faktor ist aber das Verhältnis von Kolbendurchmesser und Schüttelhub. Bei der Verwendung der Kolben mit 300 mL und 500 mL Nennvolumen ist der Radius des Kolbens etwa gleich dem Schüttelhub von 5 cm. Das Verhältnis von Energieeintrag durch die Kolbenwände gegenüber der Flüssigkeitsmenge ist daher bei diesen Kolben deutlich höher als bei dem 1000 mL-Kolben. Daher reicht der Energieeintrag beim 1000 mL-Kolben nicht aus, um gegen die Reibungskraft den Boden des Kolbens frei zu legen. Dieser Befund wird bestätigt, wenn man der Sulfitlösung Sojaöl beimengt. Auf der Glasoberfläche bildet sich ein Ölfilm, auf dem das Fluid mit weniger Widerstand gleitet. Eine Veränderung der Messdaten des 300 mL-Kolbens mit 100 mL Sulfitlösung tritt dann bereits bei 240 rpm auf. Ab 300 rpm kommt es nun auch zur Freilegung des seitlichen Pads.

4.1.3 Bestimmung des Sauerstoffeintrags anhand der numerischen Lösung eines Gleichungssystems

Die Dynamik des Sauerstoffeintrags in die Reaktionslösung basiert auf einfachen chemischen und physikalischen Zusammenhängen, die durch das folgenden Gleichungssystem beschrieben werden können. Eine Herleitung des Gleichungssystems, die in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann und Frau Dipl. Chem. Christine Klockow erörtert wurde, ist in Kapitel 2.1 dargestellt.

Für die Reaktionsgeschwindigkeit des Sulfits wird folgende Reaktionsgleichung angenommen:

$$\frac{d[SO_3^{2-}]_{aq}}{dt} = -k_R \cdot [O_2]_{aq} \cdot [SO_3^{2-}]_{aq} \quad (4.3)$$

Dabei bedeuten die Parameter:

Reaktionsgeschwindigkeit des Sulfits	$\frac{d[SO_3^{2-}]_{aq}}{dt}$
Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	k_R
Konzentration des Sauerstoffs in der Reaktionslösung	$[O_2]_{aq}$
Konzentration des Sulfits in der Reaktionslösung	$[SO_3^{2-}]_{aq}$

Bezüglich der Gelöstsauerstoffkonzentration bzw. der Sulfitkonzentration liegt folglich eine Reaktion erster Ordnung vor. Die Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung

wird durch die Geschwindigkeit der Reaktion sowie die Geschwindigkeit des Gasübergangs von der Luft in die Flüssigkeit beeinflusst. Es resultiert hieraus die Gleichung 4.4.

$$\frac{d[O_2]_{aq}}{dt} = \frac{k_L F}{V_{aq}} \cdot \left(\frac{[O_2]_g}{k_H} - [O_2]_{aq} \right) - \frac{[SO_3^{2-}]_{aq}}{2} \cdot k_R \cdot [O_2]_{aq} \quad (4.4)$$

Geschwindigkeit der Sauerstoffkonzentrationsänderung	$\frac{d[O_2]_{aq}}{dt}$
Sauerstoffübergangskoeffizient	$k_L F - \text{Wert}$
Sauerstoffkonzentration in der Gasphase im Kolben	$[O_2]_{gas}$
Henrykonstante	k_H
Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung	$[O_2]_{aq}$
Sulfitkonzentration in der Reaktionslösung	$[SO_3^{2-}]$
Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	k_R

Der erste Term beschreibt den Übergang von Sauerstoff aus dem Gasraum des Kolbens in die Flüssigphase. Treibende Kraft ist hierbei das Konzentrationsgefälle zwischen der Sauerstoffkonzentration in der Gasphase ($[O_2]_g$) und der Konzentration in der Flüssigkeit ($[O_2]_{aq}$). Der $k_L F$ -Wert ist ein Proportionalitätsfaktor, mit Hilfe dessen der Gasübergang beschrieben wird. Im Gegensatz zum $k_L F$ -Wert findet keine Normierung auf ein Volumen statt. Der zweite Term beinhaltet analog zu Gleichung 4.3 die Reaktion von Sauerstoff mit Sulfit. Für die Sauerstoffkonzentration im Gasraum des Kolbens sind darüber hinaus die Konvektion und die Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft bestimmend. Die Änderungsgeschwindigkeit für die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase wird durch die Gleichung 4.5 beschrieben:

$$\frac{d[O_2]_g}{dt} = ([O_2]_{g,0} \cdot V_{mol,O_2} - 1) \cdot \frac{k_L F}{V_g} \cdot \left(\frac{[O_2]_g}{k_H} - [O_2]_{aq} \right) + \frac{([O_2]_{g,0} - [O_2]_g)}{\tau} \quad (4.5)$$

Änderungsgeschwindigkeit der Sauerstoffkonz. in der Gasphase	$\frac{d[O_2]_g}{dt}$
Sauerstoffübergangskoeffizient	$k_L F - \text{Wert}$
Sauerstoffkonzentration in der Gasphase im Kolben	$[O_2]_g$
Henrykonstante	k_H
Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung	$[O_2]_{aq}$
Volumen der Flüssigkeit	V_l
Volumen der Gasphase im Kolben	V_g
Zeitkonstante des Systems	τ
Sauerstoffkonzentration in der Luft	$[O_2]_{g,0}$
Molvolumen des Sauerstoffs	V_{mol,O_2}

Der Übergang des Sauerstoffs in die Flüssigphase und das Nachströmen von Außenluft der Sauerstoffkonzentration $[O_2]_{g,0}$ wird im ersten Term berücksichtigt. Das molare Volumen von

Sauerstoff (V_{mol,O_2}) geht hier ebenfalls ein. Der zweite Term beschreibt die Diffusion von Sauerstoff in den Kolben. Die Differenz der Sauerstoffkonzentration im Kolben ($[O_2]_g$) und in der Außenluft ($[O_2]_{g,0}$) ist hier von Bedeutung.

Das molare Volumen von Sauerstoff und die Henrykonstante wurden der Literatur entnommen. Basierend auf den Messwerten der Gelöstsauerstoffkonzentration wurden die Parameter k_R , $k_L F$ und τ mit Hilfe eines genetischen Algorithmus und der Methode der kleinsten Fehlerquadratsumme (Matlab) angepasst. Mit diesen Parametern wurden die Verläufe von $[O_2]_g$, $[O_2]_{aq}$ und $[SO_3^{2-}]_{aq}$ simuliert.

Obwohl die einzelnen Gleichungen den Vorgang des Sauerstofftransfers vereinfacht darstellen, erhält man damit Simulationen, die für einen Teil der Messungen eine gute Übereinstimmung aufweisen. Wie aus Abbildung 4.27 hervorgeht, kann der Zeitpunkt des Konzentrationssprungs

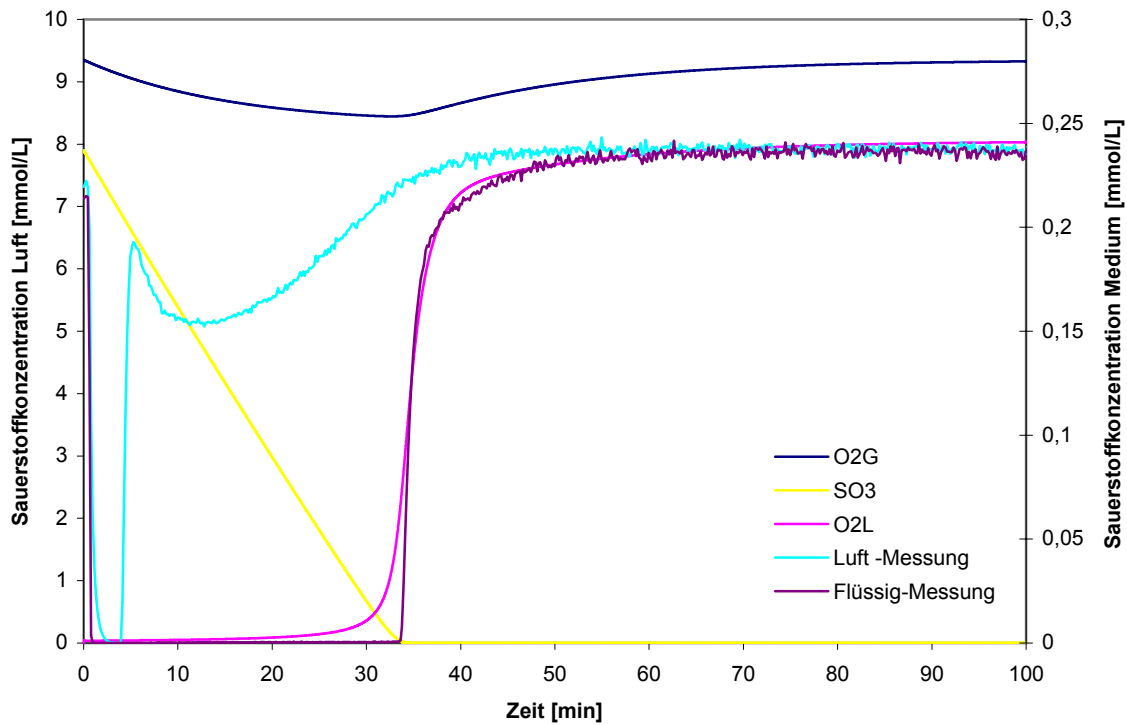


Abb. 4.27: Darstellung von Mess- und Simulationsdaten eines Experiments mit der Sulfitmethode in einem Kolben mit 300 mL Nennvolumen, 100 mL Füllvolumen bei 240 rpm und 5 cm Schüttelhub. Durch die gewählten Bedingungen wird das Farbstoffpad in der Kolbenmitte während des Experiments freigelegt.

im Medium (Flüssig-Messung) durch die Simulation (O2L) präzise erfasst werden. Der Verlauf des Übergangs vom sauerstofffreien Zustand der Reaktionslösung zum Konzentrationssprung hingegen wird nur ungenügend beschrieben. Aus allen durchgeführten Simulationen resultiert eine lineare Abnahme der Sulfitkonzentration, was für eine Limitierung der Reaktion durch die begrenzte Verfügbarkeit von Sauerstoff spricht. Die Konzentrationsverläufe der Messreihe Luft-Messung, die die Sauerstoffkonzentration am freigelegten Farbstoffpad im Zentrum des

Kolbens beschreibt, und dem simulierten Verlauf des Luftsauerstoffgehalts im Kolben (O₂G) stimmen nicht überein. Die beiden Minima sind um 20 min gegeneinander verschoben. Eine Beeinflussung der Messdaten am Farbstoffpad in der Kolbenmitte, mit dem die Datenreihe Luft-Messung aufgezeichnet worden ist, durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Der Messaufbau ist daher ungeeignet, um den Konzentrationsverlauf des Sauerstoffs im Gasraum des Kolbens zu bestimmen. Das Minimum der Sauerstoffkonzentration liegt laut Simulation unmittelbar vor dem Sprung der Sauerstoffkonzentration im Medium. Einige exemplarische Simulationswerte sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt. Für

Verschluss	Silikonkappe			Alukappe		
Nennvolumen	300 mL	500 mL	1000 mL	300 mL	500 mL	1000 mL
τ	8,8	26,7	65,2	34,8	105,7	155,83
$K_L F$	0,0322	0,0475	0,0829	0,0194	0,0352	0,0750
K_r	50					
Schüttelhub	2,5 cm			5 cm		
Kolben	2 Schikane	4 Schikane	4 Schik. PC	2 Schikane	4 Schikane	4 Schik. PC
τ	20,2	20,3	20,2	19,8	17,9	19,9
$K_L F$	0,127	0,118	0,076	0,186	0,175	0,078
K_r	50					

Tab. 4.5: Zusammenfassung der durch numerische Lösung des Gleichungssystems erhaltenen Parameter für den Sauerstoffeintrag

die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von 40 mmol/min als optimal ermittelt. Der Einfluss dieses Parameters auf den Verlauf des Graphen ist gering, wie Tests mit verschiedenen Werten ergaben.

Eine Möglichkeit, die Übereinstimmungen und Differenzen von Simulation und Messdaten des Gelöstsauerstoffgehalts darzustellen, ist die Auftragung der Datenreihen gegeneinander. Die resultierenden Kurven sind in Abbildung 4.28 auf der folgenden Seite für einige Experimente mit 100 mL Füllvolumen präsentiert. Alle Kurven sind auf der x-Achse zu höheren Werten verschoben. Dies ist das Resultat des unterschiedlichen Übergangs in den Konzentrationssprung. Im weiteren Verlauf nehmen die Kurven einen stark unterschiedlichen Verlauf. Die Kurve des Kolbens mit Silikonkappe und 300 mL Nennvolumen verläuft zumeist linear und knickt erst bei hoher Sauerstoffkonzentration ab. Mit zunehmendem Diffusionswiderstand, der in diesen Versuchen durch den Kolbenverschluss und das steigende Kolbenvolumen beeinflusst wird, weichen die Kurven immer stärker vom linearen Verlauf ab. Die Simulation des Übergangs vom Konzentrationssprung in die stationäre Sauerstoffkonzentration im Sättigungszustand ist mit diesem Gleichungssystem unzureichend. Dies deutet darauf hin, dass die Annahme über die Konstanz der Sauerstoffkonzentration über den Gasraum des Kolbens nicht korrekt ist. Der Diffusionswiderstand, der aus Kolbenverschluss und dem Gasraum des Kolbens resultiert

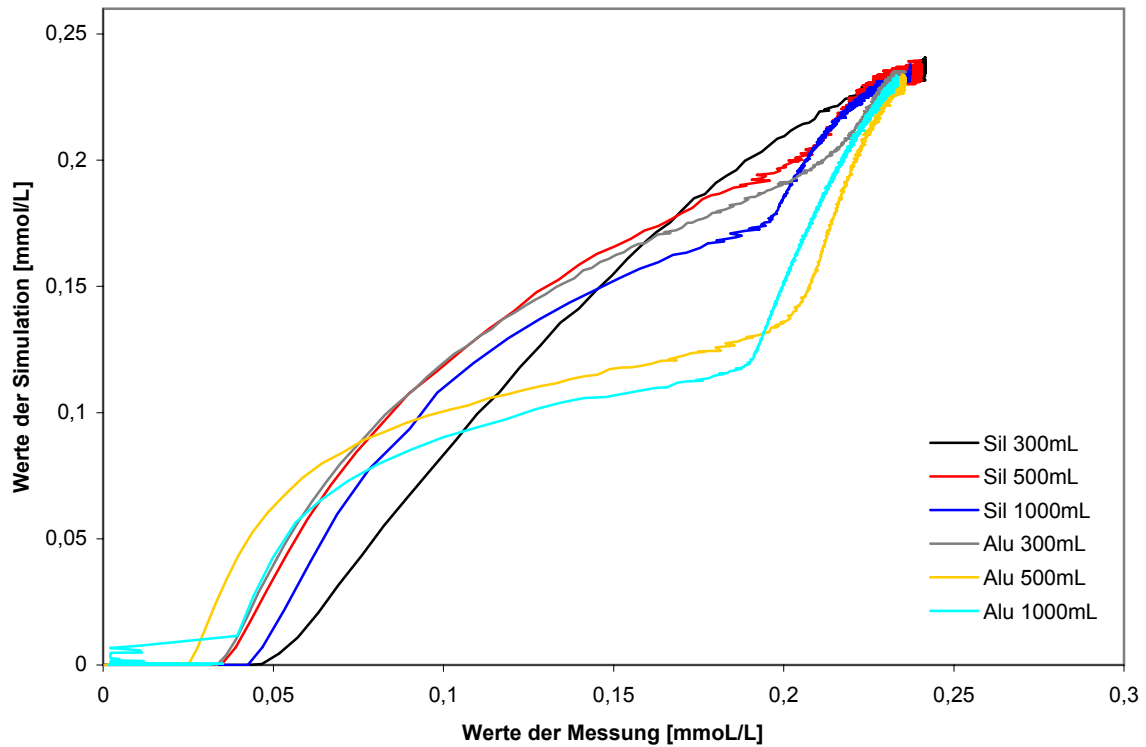


Abb. 4.28: Auftragung von Daten aus der Messung (x-Achse) und der Simulation (y-Achse) gegeneinander. Die Kürzel Sil (Silikonkappe) und Alu (Alukappe) stehen für die Art des Kolbenverschlusses, die Zahl beschreibt das Nennvolumen. Alle Experimente werden bei einem Schüttelhub von 2,5 cm, 120 rpm und 100 mL Füllvolumen durchgeführt.

wird häufig nicht experimentell erfasst und bewertet. Meyer [28] verwendet beispielsweise ein System, bei dem der k_La -Wert nach der dynamischen Methode anhand des Sauerstoffverbrauchs im Gasraum des Kolbens bestimmt wird. Es erfolgt kein Abschluss des Kolbens gegen die Umgebung. Weitere Arbeitsgruppen verwenden Methoden, bei denen der k_La -Wert durch Ausgasen bestimmt wird, wodurch ebenfalls der Diffusionswiderstand nicht erfasst wird. Um den Einfluss des Diffusionsterms aus dem Modell zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4.29 auf der folgenden Seite die jeweiligen Stoffströme aus verschiedenen Modellierungen, aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass der Diffusionsstrom maßgeblich vom Volumen des Gasraums beeinflusst wird. Sowohl die Höhe des maximalen Volumenstroms als auch die übertragene Stoffmenge sinken mit steigendem Gasraumvolumen. Die jeweils durch Diffusion übertragenen Stoffmengen sind in Tabelle 4.6 auf der folgenden Seite zusammengestellt. Die übertragene Stoffmenge wird nicht vom Kolbenverschluss beeinflusst. Betrachtet man die Kurvenverläufe, so erkennt man, dass man näherungsweise eine Gerade durch die Maxima der Kurven legen kann. Je größer die Steigung dieser Gerade ist, desto geringer ist der Diffusionswiderstand, der auf den Kolbenverschluss zurückzuführen ist.

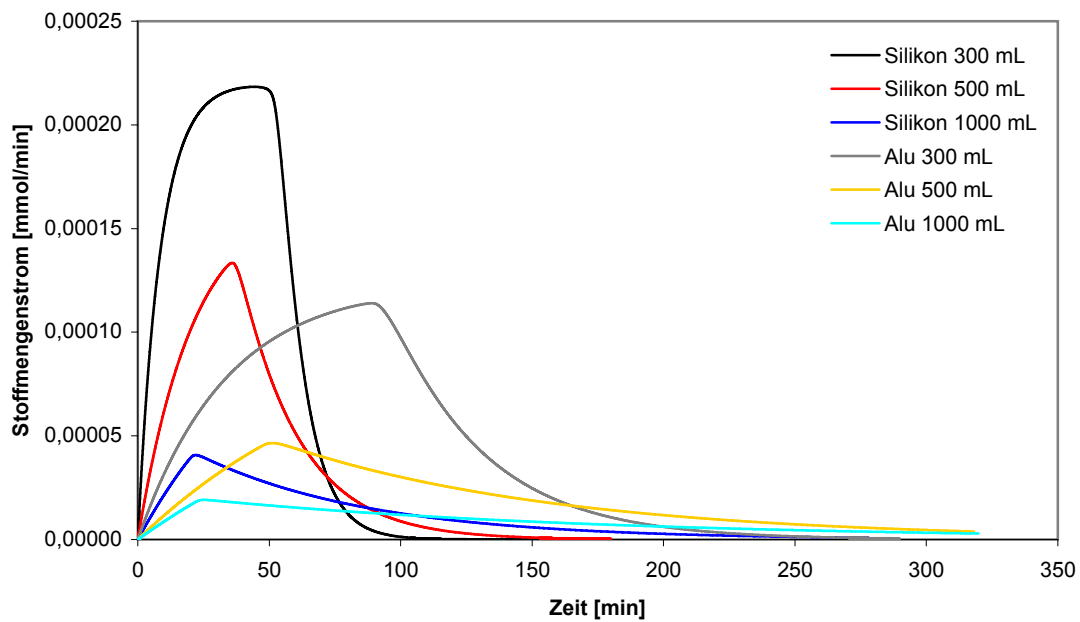


Abb. 4.29: Darstellung des Stoffstroms in den Kolben, der durch den Diffusionsterm der Gleichung beschrieben wird. Als Rahmenbedingungen werden 120 rpm Schüttelgeschwindigkeit und ein Füllvolumen von 100 mL angenommen.

Verschluss	Silikonkappe			Alukappe		
Nennvolumen	300 mL	500 mL	1000 mL	300 mL	500 mL	1000 mL
Stoffmenge [mmol]	1,1875 mL	0,6403 mL	0,3159 mL	1,1875 mL	0,5999 mL	0,2810 mL

Tab. 4.6: Zusammenstellung der durch Diffusion übertragenen Stoffmenge bei 100 mL Reaktionslösung für Simulationen mit unterschiedlichen Kolbennennvolumina

4.1.4 Charakterisierung anderer Kulturgefäße

Neben den Kolben werden in der Biotechnologie zahlreiche andere Gefäße verwendet. An einigen ausgewählten Systemen soll der Sauerstoffsensor getestet werden, indem deren Sauerstoffeintrag untersucht wird.

4.1.4.1 Charakterisierung von Prototypen einer neuen Spinnergeneration für die Kultivierung von Säugerzellen

Bei dem von der Firma Sartorius hergestellten Prototypen handelt es sich um eine Weiterentwicklung eines Spinnersystems, das kommerziell unter dem Namen Superspinner vertrieben werden soll, bestehend aus einem Magnetrührer, einer Schott-Flasche, einer Luftpumpe und dem Rührkern. Untersucht werden soll der Einfluss der Flüssigkeitsmenge und wie sich eine Änderung der Membranlänge auswirkt. Als Bedingungen wurden bei allen Experimenten eine Reaktortemperatur von 37 °C, eine Rührerdrehzahl von 40 rpm und eine Natriumsulfit-Konzentration von 0,5 % gewählt. Temperatur und Drehzahl sind typisch für Säugerzellkultivie-

rungen. Die Experimente zu diesem Kapitel wurden gemeinsam mit Frau Dana Schiefelbein durchgeführt [41].

Beim Betrieb wird der Rührkern mit dem Magnetrührer, der unterhalb der Schottflasche positioniert wird, gerührt. Gleichzeitig wird Luft durch einen Membranschlauch, der auf auf dem Rührkern aufgewickelt ist, geleitet. Es kommt so zu einem erhöhten Sauerstoffeintrag gegenüber den Standardspinnern. Der Kopfraum der Schottflasche und der Membranschlauch werden so miteinander verbunden, dass der Luftdruck zwischen dem Eingang der Membran und dem Kopfraum identisch ist, um Blasenbildung zu unterbinden. Der wesentliche Unter-

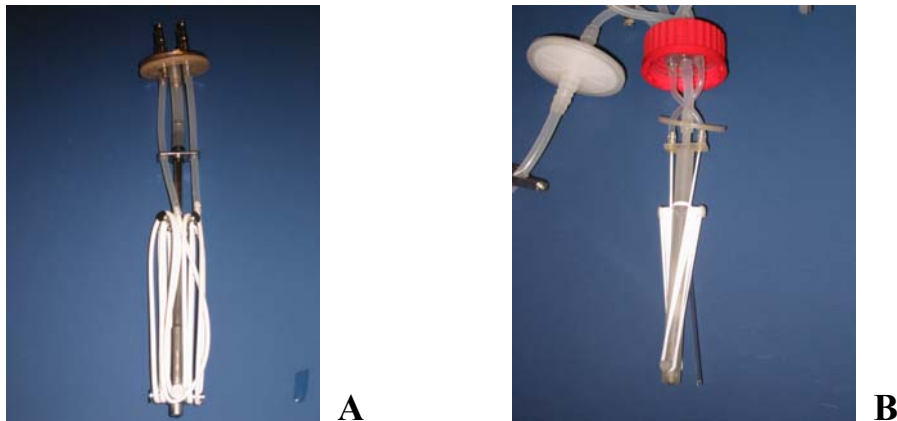


Abb. 4.30: Abbildung des alten und des Rührkerns für das Superspinner-System.

schied zwischen den beiden Systemen besteht in der Dimensionierung der Membran. Beim alten System, in Abbildung 4.30 mit „A“ bezeichnet, wird eine Polypropylen-Membran mit einer Länge von 1,5 m und einem Innendurchmesser von 2 mm verwendet. Beim neuen System, in Abbildung 4.30 mit „B“ bezeichnet, wird beim ersten Prototypen ein Membranbündel aus 5 identischen Membranen von 2 m Länge (5x2) und einem Innendurchmesser von 0,28 mm verwendet. Bei weiteren Experimenten werden Membranbündel aus 10 Membranen à 1 m (10x1)

	altes System	neues System		
Typ		5x2	10x1	10x2
Volumenstrom [L/h]	49,67	1,98	4,92	3,72
Druckabfall in der Membran [Pa]	$4,87 \cdot 10^1$	$1,38 \cdot 10^3$	$1,21 \cdot 10^3$	$8,39 \cdot 10^2$
k_{La} -Wert [h^{-1}]	8,272	1,953	2,023	1,941

Tab. 4.7: Die Tabelle gibt eine Übersicht über einige relevante Größen der verschiedenen Spinnersysteme für den Sauerstoffeintrag wider.

und 10 Membranen à 2 m (10x2) verwendet. Die neuen Systeme sind im Gegensatz zum alten als Einwegartikel ausgelegt. Die Größe der Membranoberflächen des alten Systems sowie der Systeme 5x2 und 10x1 sind identisch. Aufgrund des geringeren Durchmessers der Membranen

des neuen Systems ist sowohl der Querschnitt einer Membran als auch des gesamten Membranbündels geringer. Hieraus resultiert ein verringerter Luftdurchsatz durch die Membran. Der Luftdurchsatz, der durch die Modifikation für das jeweilige System resultiert, ist in Tabelle 4.7 auf der vorigen Seite angegeben. Die Bedeutung des Querschnitts für den Druckabfall in der Membran geht aus dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz (Formel 4.6) hervor:

$$\Delta p = \frac{8 \cdot \eta_{Luft} \cdot \dot{V}_{Laminar}}{\pi \cdot d^4} m \cdot L \quad (4.6)$$

Druckabfall	Δp
Viskosität der Luft	$\eta_{Luft} = 1,5 \cdot 10^{-5} Pa \cdot s$
Volumenstrom	$\dot{V}_{Laminar}$
Durchmesser der Membran	d
Länge der Membran	L

Beim alten System wurde mit der zum System gehörigen Pumpe ein Luftdurchsatz von 49,67 L/h erzielt. Beim System 5x2 betrug der Luftdurchsatz 1,98 L/h. Durch eine Verdopplung des Querschnitts als Resultat aus der Verdopplung der Anzahl der Membranen beim Prototypen 10x2 kann der Luftdurchsatz auf 3,7 L/min erhöht werden. Durch die Halbierung der Membranlänge auf 1 m beim Prototypen 10x1 wird der Luftdurchsatz auf 4,9 L/min gesteigert. Die Erhöhung des Luftdurchsatzes spiegelt sich nicht im $k_L a$ -Wert wider. Die Änderungen durch die Variation der Membran sind minimal. Der Einfluss der Füllhöhe auf den $k_L a$ -Wert wurde mit einem früheren Prototyp des 5x2-Typs untersucht. Aus den in Abbildung 4.31

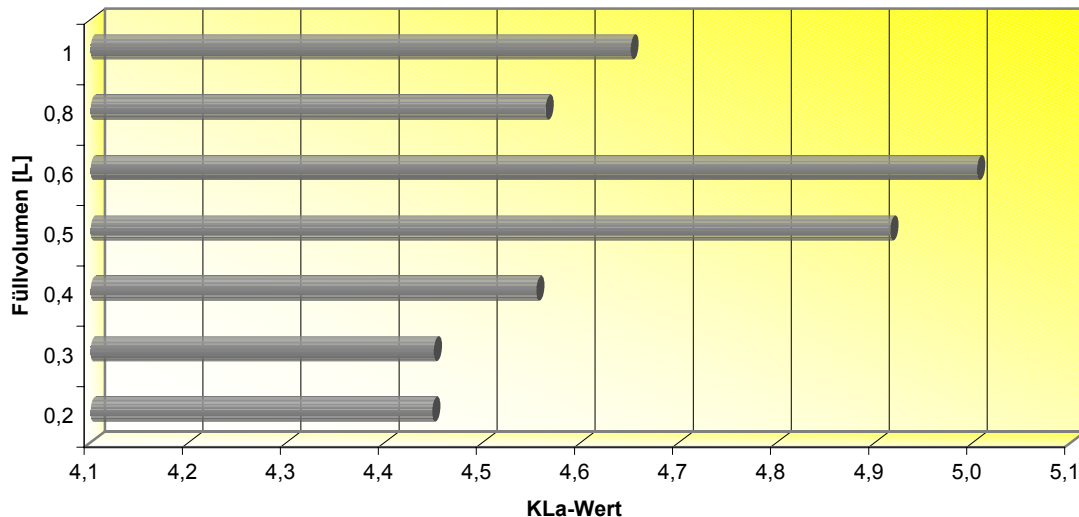


Abb. 4.31: Zusammenstellung der $k_L a$ -Werte des Superspinners die bei unterschiedlichen Füllvolumina erzielt werden. Für die Experimenten wurde eine Temperatur von 37 °C und eine Drehzahl von 40 rpm eingestellt

dargestellten Messdaten ist ersichtlich, dass bei einem Füllvolumen von 0,5 L bis 0,6 L der höchste Wirkungsgrad erreicht wird. Unterhalb dieses Volumens nimmt die Sauerstoffübertragungsrate durch eine Verringerung des Bedeckungsgrades der Membranen ab. Oberhalb der optimalen Füllhöhe nimmt der relative Anteil des Sauerstoffeintrags, der durch die Kopfraumbegasung erreicht wird, ab, so dass es zu einer Verringerung der Sauerstoffübertragungsrate insgesamt kommt. Eine Steigerung des k_La -Werts kann auch durch eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit erzielt werden. Beim System 5x2 kann der k_La -Wert durch eine Steigerung der Rührerdrehzahl von 40 rpm auf 80 rpm von $1,95 \text{ h}^{-1}$ auf $2,24 \text{ h}^{-1}$ gesteigert werden. Die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit ist beim Einsatz des Systems in der Zellkultur aufgrund des ansteigenden Scherstress kritisch.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der k_La -Wert des Superspinners sowohl vom Volumenstrom durch die Membran, als auch vom Bedeckungsgrad der Membran, somit dem Füllstand in der Kulturflasche und der Drehzahl des Rührkerns, abhängig ist. Die Variation dieser Parameter ist jedoch aus technischen Gründen begrenzt. Eine deutliche Steigerung des k_La -Werts ist auf diesem Weg nicht möglich. Hierfür ist eine Modifikation des Systems notwendig. Maßgeblich für den k_La -Wert ist der Sauerstoffdurchgang durch die Membran. Die Menge des Sauerstoffs, der die Membran durchtritt, beträgt beim alten System 0,093 %, bei den Systemen 5x2 0,55 %, 10x1 0,22 % bzw. 10x2 0,29 %. Das größte Entwicklungspotenzial liegt somit in der Membranstruktur. Eine weitere Variante, den Sauerstoffeintrag zu erhöhen, ist die Erhöhung des Druckes im Gesamtsystem. Auf diese Weise wird der Volumenstrom durch die Membran und gleichzeitig die Sauerstofflöslichkeit im Medium erhöht. Ein Versuch, den k_La -Wert unter Kulturbedingungen mit Kohlendioxidbegasung zu untersuchen, scheiterte an der pH-Wert-Abhängigkeit der Reaktion. Durch das Kohlendioxid, dass während der Reaktion in Lösung geht, wird der pH-Wert soweit abgesenkt, dass die Reaktion unterbrochen wird.

4.1.4.2 Charakterisierung eines Bioreaktors am Beispiel des Biostat B

Rührkesselreaktoren sind in der industriellen Biotechnologie häufig verwendete Reaktortypen. Das Verhalten des k_La -Werts bei Variation von Rührerdrehzahl und Begasungsrate soll in diesem Kapitel am Beispiel eines 2 L Laborreaktors des Typs Biostat B der Firma Sartorius untersucht werden. Es wurde mit einer 1 %igen Natriumsulfitlösung bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gearbeitet. Für die Messungen dieses Kapitels wurde der selbe Versuchsaufbau wie in den im Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Experimenten verwendet. In Abbildung 4.32 auf der folgenden Seite sind die aus den Messergebnissen resultierenden k_La -Werte dargestellt. Wie erwartet steigt dieser aufgrund des steigenden Energieeintrags und der hieraus resultierenden Abnahme der Blasengröße mit der Erhöhung der Drehzahl stetig an. Im Gegensatz dazu wird bei Steigerung der Begasungsrate kein einheitlicher Effekt beobachtet. Auch wenn die Überflutungsgrenze

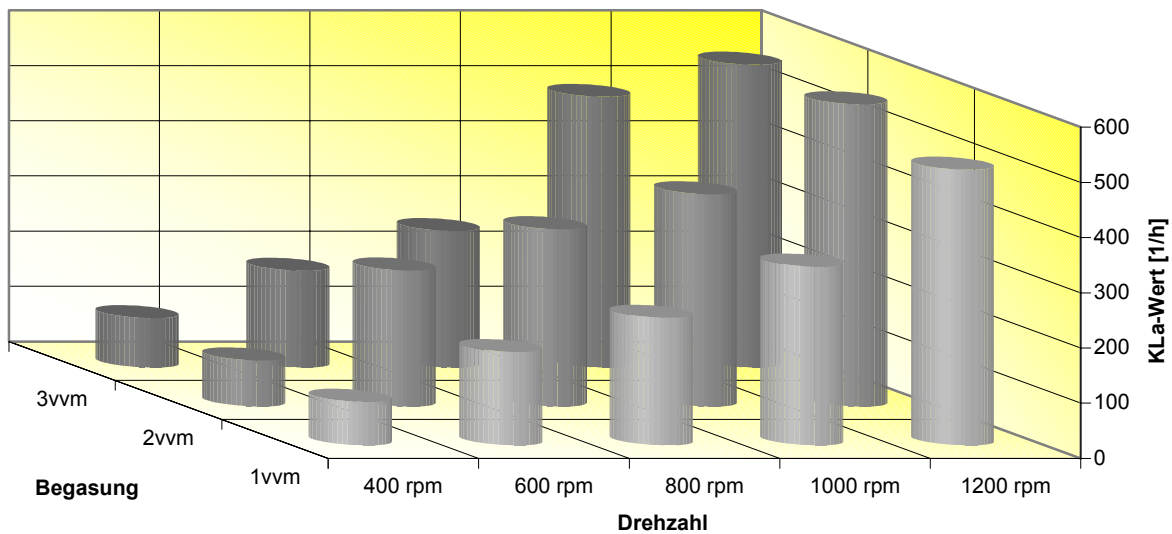


Abb. 4.32: Dieses Diagramm stellt die Abhängigkeit des k_{La} -Werts von Rührerdrehzahl und Begasungsrate dar.

gemäß Formel 4.1 nicht erreicht wird, erkennt man, dass bei 600 rpm und 800 rpm ein Maximum des k_{La} -Werts bei einer Begasungsrate von 2 vvm vorliegt. Man geht davon aus, dass die Blasengrößenverteilung aus dem Energieeintrag resultiert. Die Energiemenge, die zur Gasdispersion zur Verfügung steht sinkt, wenn die Drehzahl konstant bleibt und der Gasvolumenstrom ansteigt. Es kommt demzufolge nicht zu einer stetigen Steigerung des k_{La} -Wert mit der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl, sondern es gibt ein Maximum, das durch die antagonistischen Parameter minimale Blasengröße und maximaler Sauerstoffdurchsatz definiert wird. Es kann festgehalten werden, dass es für die verwendeten Bioreaktoren nicht sinnvoll ist, die Begasung, insbesondere bei mittlerer Drehzahl, über einen Wert von 2 vvm zu steigern. Mit realen, zellhaltigen Medien, die im Gegensatz zur verwendeten Sulfitlösung eine Viskosität aufweisen, die deutlich größer als die des Wassers ist, ist eine geringere Begasungsrate anzusetzen, da die Energie, die für die Dispersion des Gases zur Verfügung steht, aufgrund des steigenden Energieaufwands für das Bewegen der Flüssigkeit sinkt. Erst bei hohen Drehzahlen führt eine Begasung von mehr als 2 vvm auch zu einer Erhöhung des Sauerstoffeintrags. Der Effekt auf den Sauerstoffeintrag, der durch eine Erhöhung der Drehzahl erreicht wird, ist immer größer als es bei einer Erhöhung der Begasungsrate der Fall ist.

4.2 Verwendung des optischen Systems bei der Kultivierung von Mikroorganismen

Neben den Untersuchungen zum $k_L a$ -Wert mit einem chemischen Modellsystem sollen im Rahmen dieser Arbeit auch Messungen in realem Medium durchgeführt werden. Im Vordergrund dieser Untersuchungen soll die Ermittlung der Durchführbarkeit dieser Messungen stehen. Eine detaillierte Untersuchung des Sauerstoffübergangs, wie im Modellsystem mit der Sulfitlösung wird nicht durchgeführt, da sich während der Kultivierung eine Vielzahl der maßgeblichen Parameter (Sauerstoffverbrauch, Oberflächenspannung, Kohlendioxidproduktion, Viskosität, usw.) ändern können, so dass eine isolierte Betrachtung der für den Sauerstoffeintrag relevanten Größen nicht möglich ist. Bei den Kultivierungen im Bioreaktor wurde stets eine Clark-Elektrode (InPro 6000, Fa. Mettler-Toledo) als Referenz eingesetzt, um die Medieneinflüsse auf das jeweilige Messsystem zu untersuchen.

4.2.1 Kultivierungen im Schüttelkolben

In diesem Kapitel sind jeweils exemplarische Kultivierungen von Hefen, Bakterien, Pilzen und Algen beschrieben. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Einsetzbarkeit des Systems für die verschiedenen Organismen zu ermitteln. Auch die Verwendbarkeit der unterschiedlichen Kolbenmaterialien für die Kultivierungen wird in diesem Kapitel untersucht.

4.2.1.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* im Schüttelkolben

Saccharomyces cerevisiae ist ein Modellorganismus, der in der Biotechnologie häufig kultiviert wird, da Stoffwechsel und Genom gut untersucht sind und man die Kultivierung gut beherrscht. Als Medium wird Schatzmann-Medium verwendet (Anhang A.2). Hier steht als Kohlenstoff- und Energiequelle zunächst nur Glucose zur Verfügung. Im weiteren Verlauf der Kultivierung werden auch die Metabolite Ethanol und Essigsäure im Zellstoffwechsel umgesetzt. In Abbildung 4.33 wird deutlich, dass der Sauerstoffeintrag durch Schikanen deutlich verbessert wird. Nach etwa 22 h wird die Drehzahl des Schüttlers erstmalig erhöht (150 rpm auf 180 rpm), da die Sauerstoffkonzentration im Kolben ohne Schikanen auf ca. 10 % abgesunken ist. Im Kolben mit Schikanen liegt zu dieser Zeit die Gelöstsauerstoffkonzentration oberhalb von 80 %. Diese Maßnahme kann nicht verhindern, dass der Sauerstoffgehalt im Kolben ohne Schikane nach 24 h auf 0 % absinkt und trotz weiterer Erhöhung der Drehzahl nicht wieder ansteigt. Durch die Erhöhung der Drehzahl auf 240 rpm nach 25 h und auf 280 rpm nach 31 h kann im PC-Kolben eine Sauerstofflimitierung in der Kultur verhindert werden. Aus dem Anstieg der Sauerstoffkonzentration im PC-Kolben nach 37 h kann gefolgert werden, dass zu diesem Zeitpunkt das Substrat Glucose vollständig abgebaut ist. Ursächlich für die dann folgende Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration bis zur 39. Stunde ist der oxidative Abbau des Ethanol. Ethanol wird während der Kultivierung trotz des Sauerstoffs

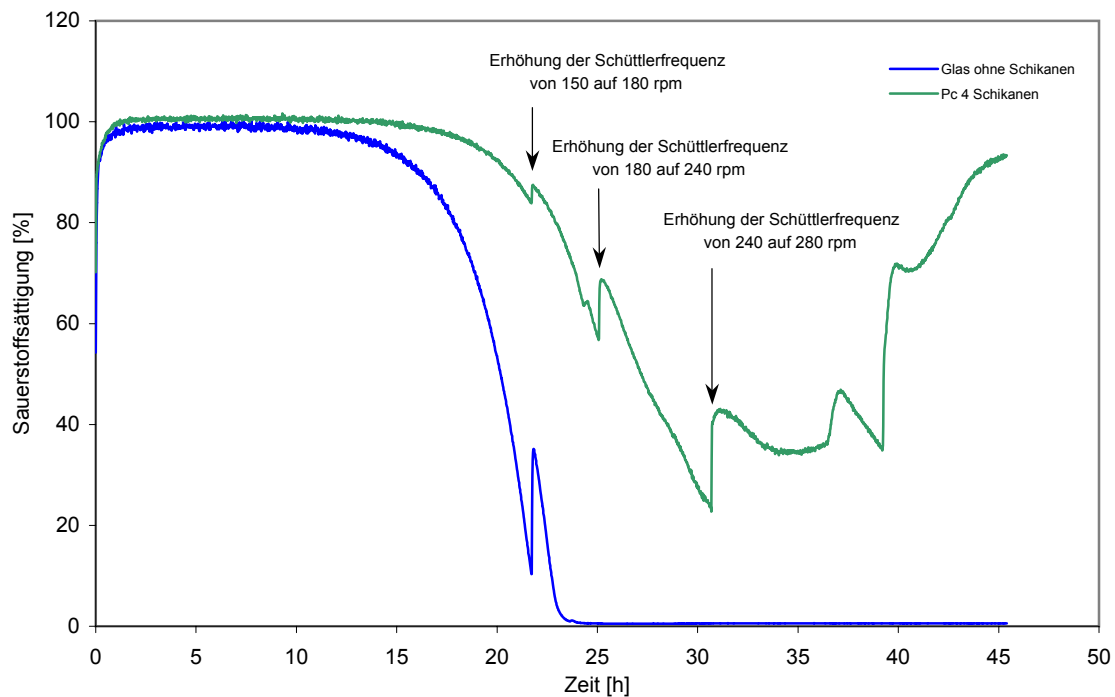


Abb. 4.33: Das Diagramm gibt den Verlauf des Sauerstoffgehalts während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wider. Während der Kultivierung wird die Drehzahl des Schüttlers drei mal erhöht. Als Kulturgefäße werden ein Glaskolben mit 500 mL Nennvolumen und ein Polycarbonatkolben mit 500 mL Nennvolumen und 4 Schikanen verwendet. Der Schüttelhub beträgt 2,5 cm

in Lösung gebildet, da es bei hoher Glucosekonzentration zu einer intrazellulären Sauerstofflimitierung als Resultat einer Transportlimitierung kommt. Anschließend kommt es zu einer weiteren Stoffwechselumstellung, erkennbar aus den Daten am Anstieg der Sauerstoffkonzentration auf 70 %, gefolgt von einem weiteren Minimum nach 41 h. In diesem Zeitraum wird Acetat abgebaut. Somit ist die letzte Energiequelle im Medium abgebaut, die Gelöstsauerstoffkonzentration steigt bis zum Abbruch der Messung nach 45 h auf 90 % an. Dieser Verlauf ist typisch für die Kultivierung von Hefe und wird auch im Bioreaktor beobachtet. Die Stoffwechselpeaks von Acetat und Ethanol werden bei der Arbeit mit Hefekulturen daher häufig zum Triggern verwendet [24].

Es kann zusammengefasst werden, dass der Einsatz des Messsystems in Hefekulturen möglich ist. Aus den Messdaten können, unter geeigneten Kulturbedingungen, Rückschlüsse auf den Zellstoffwechsel gezogen werden. Die gewählte Messfrequenz von 1 min^{-1} ist ausreichend, um den Sauerstoffverlauf während der Kultivierung aufzuzeichnen. Beide Kolbenmaterialien sind für die Kultivierung von Hefen geeignet. Die Bildung von Schaum ist bei beiden Kolben nicht zu beobachten. Durch die hohe Drehzahl kommt es jedoch beim PC-Kolben aufgrund der

Schikanen zur Bildung von Spritzern, weshalb auf eine weitere Erhöhung der Schüttelfrequenz verzichtet wird.

4.2.1.2 Kultivierung von *Escherichia coli* im Schüttelkolben

Neben *Saccharomyces cerevisiae* ist auch das Bakterium *Escherichia coli* ein verbreiteter Modellorganismus in der Biotechnologie. Gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* wachsen *Escherichia coli*-Bakterien etwa mit doppelter Geschwindigkeit und stellen weniger Ansprüche an das Kulturmedium. Im Rahmen dieser Messung wird untersucht, wie sich die Probenahme auf den Verlauf des Gelöstsauerstoffs auswirken. Darüber hinaus wird einer der beiden Kulturen Nalidixinsäure (5 mg/L im Kulturmedium) zugesetzt. Nalidixinsäure wirkt gegen gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* antibiotisch [17]. Sie fungiert als Gyrase-Hemmer. Aus diesem Mechanismus resultieren Auswirkungen auf die DNA-Replikation, die zur Superspiralisierung der DNA und schließlich zum Absterben der Bakterien führt. In subletaler Konzentration vermutet man Auswirkungen auf die Genexpression. Das Experiment wurde in Anlehnung an Engel [19] durchgeführt, um die Sauerstoffversorgung der Zellen während der Kultivierung zu untersuchen. Es werden 1000 mL-Kolben verwendet, die mit je 1000 mL einer *Escherichia coli*-Kultur mit einer optischen Dichte von 0,45 in LB-Medium (Anhang A.2) befüllt werden. Zu Beginn und nach 12 min werden je 200 mL Probe abgefüllt. Jeweils 100 mL werden nach 40 min und 100 min, jeweils 50 mL nach 140 min und 270 min entnommen. Die Schüttelfre-

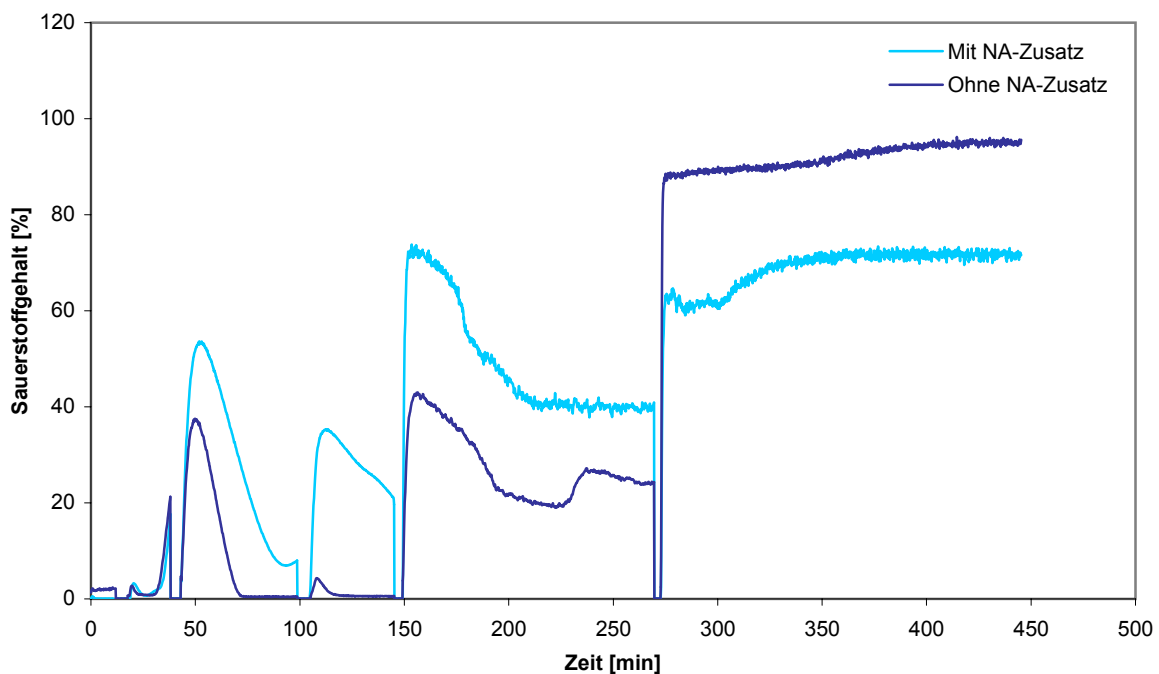


Abb. 4.34: In diesem Diagramm sind die Sauerstoffdaten aus einer Kultivierung von *Escherichia coli* mit und ohne Nalidixinsäure dargestellt. Gut zu erkennen sind die Zeiträume, während der die Proben entnommen wurden.

quenz während des Experiments beträgt 180 rpm, die Temperatur wird auf 37 °C eingestellt. In der Abbildung 4.34 auf der vorigen Seite sind die Zeitpunkte der Probenahme eindeutig daran zu erkennen, dass der Gelöstsauerstoffgehalt den Wert 0 % annimmt. Ebenso ist zu sehen, dass die Nalidixinsäure auch in der Konzentration von 5 ppm Einfluss auf das Zellwachstum nimmt. Der Gelöstsauerstoffgehalt in der Kultur mit Nalidixinsäure liegt bis zur letzten Probenahme stets oberhalb derer ohne Nalidixinsäure. Zwar kommt es während der Kultivierung zu einem Anstieg der Biomassekonzentration, die optische Dichte steigt in der Kultur mit Nalidixinsäure auf den Wert 6, ohne Nalidixinsäure auf den Wert 7, der Sauerstoffbedarf der Kulturen steigt hingegen in geringerem Maß, da das Kulturvolumen von 1000 auf 300 mL gesenkt wird. Aus der abnehmenden Substratkonzentration folgt eine weitere Abnahme des Sauerstoffbedarfs. Gegenläufig zum Sauerstoffbedarf steigt die Sauerstofftransferrate während der Kultivierung, da sowohl die absolute als auch die relative Gastransferfläche mit abnehmendem Kulturvolumen steigen. Anhand des Verlaufes der Sauerstoffkonzentration ist der höhere Substratumsatz der Kultur ohne Nalidixinsäure zu erkennen. Es kommt hier zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration in ein lokales Maximum nach 230 min. Dieses Maximum tritt - schwächer ausgeprägt - in der Kultur mit Nalidixinsäure nach 320 min auf. Nach der letzten Probenahme ist das Substrat der Kultur ohne Nalidixinsäurezusatz fast vollständig abgebaut, woraus ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Medium auf einen Wert von fast 100 % resultiert. Ein solcher Anstieg wird bei der Kultur mit Nalidixinsäurezusatz bis zum Abbruch nach etwa 450 min nicht beobachtet. Um den Zeitraum der Probenahme anhand der Daten hinreichend präzise eingrenzen zu können, war eine Messfrequenz von 6 min^{-1} notwendig.

4.2.1.3 Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* im Schüttelkolben

Die bisher verwendeten Medien werden häufig für Kultivierungen im Labormaßstab verwendet. Es handelt sich dabei um partikelfreie Lösungen. In der industriellen Biotechnologie werden hingegen häufig Medien verwendet, die aus Naturstoffen zusammengestellt werden. Als Substrate können wasserunlösliche Substanzen wie Stärke, Sojamehl oder Öle eingesetzt werden. Die Durchführbarkeit einer Kultivierung im Schüttelkolben mit einem Industriemedium soll in diesem Kapitel anhand des Beispiels *Acremonium chrysogenum* untersucht werden. Darüber hinaus entsteht bei der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* ein Medium mit sehr hoher Viskosität. Daher kann anhand dieses Experiments auch untersucht werden, ob ein Einsatz des Messsystems in viskosen Fluiden sinnvoll ist. Dies ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf eine Verwendung des Systems in Bioreaktoren im Produktionsmaßstab. Es werden zwei unterschiedliche Messungen dargestellt. In einer Messreihe werden Glaskolben mit 2, 3 und 4 Schikanen sowie ein Polycarbonatkolben mit 4 Schikanen verwendet, in der zweiten Messreihe Glaskolben ohne Schikanen mit 300 mL, 500 mL und 1000 mL Nennvolumen sowie

ein 500 mL Kolben ohne Schikane aus Polycarbonat verwendet. Die Kolben werden mit Silikonkappen verschlossen. Lediglich der Polycarbonatkolben ohne Schikanen wird mit dem zum Kolben gelieferten Schraubverschluss mit einer Membran als Sterilbarriere verschlossen. Jeder Kolben wird nach dem Sterilisieren mit 100 mL sterilem CFC 3-Medium (s. Anhang A.2) befüllt. Die Kultivierungen werden bei 25 °C und 2,5 cm Schüttelhub durchgeführt. Begonnen wird mit einer Schüttlerdrehzahl von 240 rpm. Aufgrund des niedrigen Gelöstsauerstoffgehalts wird diese nach 45 h auf 280 rpm und nach 59 h auf 300 rpm erhöht. Der Vergleich der Daten

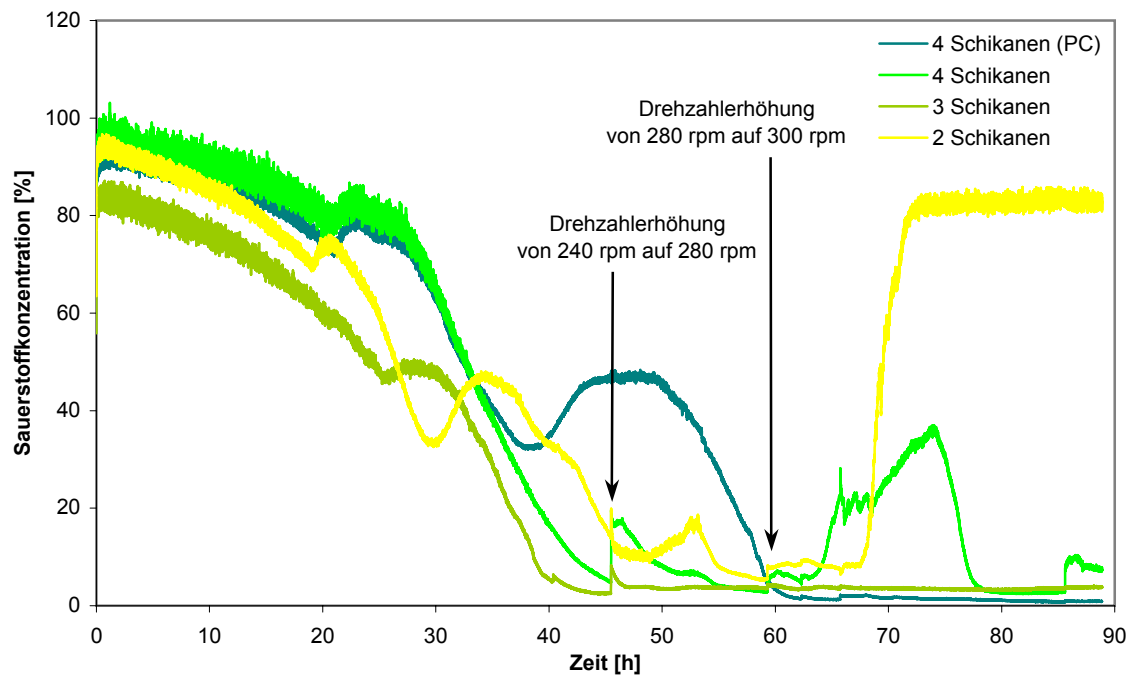


Abb. 4.35: Dieses Diagramm gibt den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen im Medium von Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* in Kolben mit unterschiedlicher Schikanenanzahl wider.

aus der Messreihe mit unterschiedlicher Schikanenanzahl ist schwierig. Aufgrund des variierenden Sauerstoffeintrags kommt es zu unterschiedlicher Biomassebildung. Bei den Glaskolben mit 2 und 4 Schikanen werden Zellpellets gebildet. Beim Kolben mit 2 Schikanen ist am Ende der Kultivierung die gesamte Biomasse in 3 Pellets von mehreren Kubikzentimetern Größe vereinigt, was eine starke Wachstumshemmung zur Folge hat. Die gemessenen Sauerstoffkonzentration repräsentiert daher nicht die Stoffwechselaktivität der gesamten Kultur. Durch die Pelletierung kann somit der Anstieg der Sauerstoffkonzentration nach 68 h Kultivierungszeit bei diesem Kolben erklärt werden. Bei allen Kulturen ist hingegen zu erkennen, dass es zwischen 15 h und 27 h zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration in ein Maximum kommt. Bei den Glaskolben mit 3 und 4 Schikanen wirkt sich die steigende Viskosität der Kulturbrühe um 40 h erheblich auf den Sauerstoffeintrag aus. Die Kulturen gehen in den anaeroben Zustand

über. Nach 45 h wird die Drehzahl des Schüttlers daher von 240 rpm auf 280 rpm angehoben. Nachhaltige Auswirkungen auf die Sauerstoffversorgung der Zellen werden nur bei den Kolben mit 3 und 4 Schikanen beobachtet. Bei den anderen beiden Kolben wird lediglich eine kurzfristige Schwankung der Sauerstoffkonzentration beobachtet. Beim Polycarbonatkolben wird der schwächste Effekt beobachtet. Offenbar entwickeln die Schikanen unter den vorherrschenden Bedingungen bereits bei einer Drehzahl von 240 rpm ihre optimale Wirkung. Eine weitere Ursache ist der relativ hohe Gelöstsauerstoffgehalt, der auf verringerte Stoffwechselaktivität zum Zeitpunkt der Drehzahlerhöhung auf 240 rpm hin deutet. Nach 59 h, bei der zweiten Erhöhung der Drehzahl, wird erneut festgestellt, dass die maximale Wirksamkeit der flacheren Schikanen im Glaskolben mit 3 bzw. im Polycarbonatkolben mit 4 Schikanen erreicht ist. Es kommt zu keiner Änderung der Sauerstoffkonzentration bei diesen Kolben. Bei den Kolben mit tieferen Schikanen wird ein leichter Anstieg des Gelöstsauerstoffgehalts beobachtet. Quintessenz dieser Messungen ist, dass sich der Polycarbonatkolben aufgrund des Sauerstoffeintrags ins Medium am besten für diese Kultivierung eignet. Man erreicht bereits unterhalb von 240 rpm den maximalen Sauerstoffeintrag. Bei den Kolben mit den tieferen Schikanen kann durch eine Erhöhung der Drehzahl eine stetige Erhöhung des Sauerstoffeintrags generiert werden, es kommt aber zur Bildung von Zellpellets, die die Produktivität der Kultur beeinträchtigen. In anderen Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum* wird beobachtet, dass es verstärkt zur Ausbildung von größeren Agglomeraten kommt, wenn die Zellen Stress ausgesetzt sind, insbesondere bevor sie an ein neues Medium adaptiert haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass der vergrößerte Scherstress, der nach der letzten Erhöhung der Schüttlerdrehzahl auftritt, das Zellwachstum beeinträchtigt und die Pelletierung auslöst.

In einem weiteren Experiment wird soll der Einfluss des Kolbennennvolumens auf den Verlauf des Gelöstsauerstoffs untersucht werden. Hierfür werden 4 identische Kulturen in Glaskolben mit einem Nennvolumen von 300 mL, 500 mL bzw. 1000 mL sowie in einem Polycarbonatkolben mit 500 mL Nennvolumen angesetzt. Als Kulturvolumen werden jeweils 100 mL, als Temperatur 25 °C und als Schüttlerdrehzahl 320 rpm bei 2,5 cm Schüttelhub gewählt. In der Abbildung 4.36 auf der folgenden Seite sind die Daten dieser Kultivierungen zusammengefasst. Vergleicht man die Daten mit denen in Abbildung 4.35 auf der vorigen Seite erkennt man Parallelen im Verlauf. In beiden Experimentreihen durchlaufen die Sauerstoffverläufe zwei Maxima. Da der Sauerstoffeintrag bei den Kolben ohne Schikanen geringer ist, ist der maximale Wert des Gelöstsauerstoffs in diesen Bereichen geringer als bei den Schikanekolben. Darüber hinaus werden die Maxima später durchlaufen als bei den Schikanekolben. Vergleicht man die Messkurven in Abbildung 4.36 auf der folgenden Seite untereinander, so erkennt man Übereinstimmungen zu den entsprechenden Experimenten mit Sulfit als Sauerstoffsenske (Kapitel 4.1.2.2). Zwar ist die Gasaustauschfläche beim 1000 mL-Kolben am größten, die Konzentration des Gelöstsauerstoffs verläuft jedoch, bedingt durch den geringeren Gasaus-

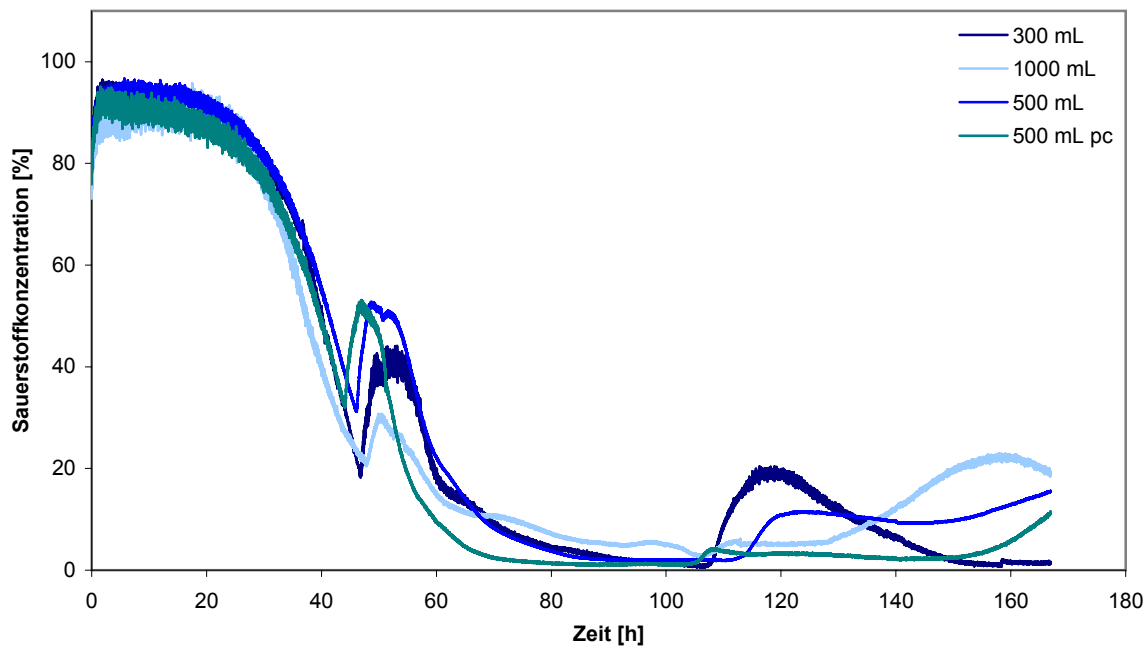


Abb. 4.36: Diese Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffkonzentration in Kulturen von *Acremonium chrysogenum* dar, die in Kolben mit unterschiedlichen Nennvolumina bei identischem Kulturvolumen durchgeführt wurden.

tausch mit der Umgebung, unterhalb derer der anderen Kolben. Die Maxima, die Resultat aus Substratmangel und einer folgenden Stoffwechselumstellungen sind, sind umso stärker ausgeprägt, je kleiner der Kolben ist. Ursache ist die geringere Sauerstoffmenge im Gasraum kleiner Kolben. Der Sauerstofftransport durch den Kolben ist der limitierende Schritt in der Transportkette. Durch ein großes Gasvolumen können Schwankungen im Sauerstoffumsatz gedämpft werden. Erst nach etwa 70 h dominiert der Sauerstoffeintrag durch die Grenzfläche den Gelöstsauerstoffgehalt. Der Sauerstoffeintrag der beiden 500 mL-Kolben unterscheidet sich nur geringfügig. Die Maxima werden von der Kultur im PC-Kolben früher durchlaufen, was auf ein schnelleres Anwachsen der Biomasse hindeutet. Die Gelöstsauerstoffkonzentration ist hingegen geringer als beim Glaskolben.

Fazit dieser Messungen ist, dass die Daten aus den Kultivierungen mit denen aus den chemischen Experimenten mit Sulfit vergleichbar sind. Bei Organismen, die sensibel gegenüber Schwankungen der Sauerstoffkonzentration sind, ist ein großer Kolben zu bevorzugen. Ist über einen möglichst langen Zeitraum eine hohe Sauerstoffkonzentration notwendig, ist ein kleiner oder mittelgroßer Kolben zu bevorzugen. Ein kleiner Kolben ist von Vorteil, wenn schnell ablaufende Prozesses, wie wie beispielsweise Stoffwechselschwankungen, beobachtet werden, da diese hier am deutlichsten erkennbar werden.

4.2.1.4 Kultivierung von *Euglena gracilis* im Schüttelkolben

Bei *Euglena gracilis* handelt es sich um einen Organismus aus der Klasse der Euglenopyceae, der sowohl als heterotrophe als auch als photoautotrophe Form vorkommt. [21] Während *Euglena gracilis* in der photoautotrophen Form Chlorophyll produziert, wird in der heterotrophen Form Paramylon gebildet, ein 1,3- β -Glucan, dessen industrielle Herstellung [37] und pharmazeutisch Anwendung [26][45] Gegenstand der Forschung ist. Ein vollständiger Übergang von der heterotrophen in die phototrophe Form ist binnen weniger Generationen durch die Einstellung der entsprechenden Bedingungen möglich. Im folgenden Experiment soll untersucht werden, ob der Einfluss des Chlorophylls auf den Gelöstsauerstoff gemessen werden kann. Hierfür werden zwei 500 mL-Kolben ohne Schikanen mit je 100 mL synthetischem Medium (die Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang A.2 beschrieben) sterilisiert und aus einer bestehenden, heterotrophen Kultur mit 10 mL Inoculum beimpft. Als Kolbenverschlüs-

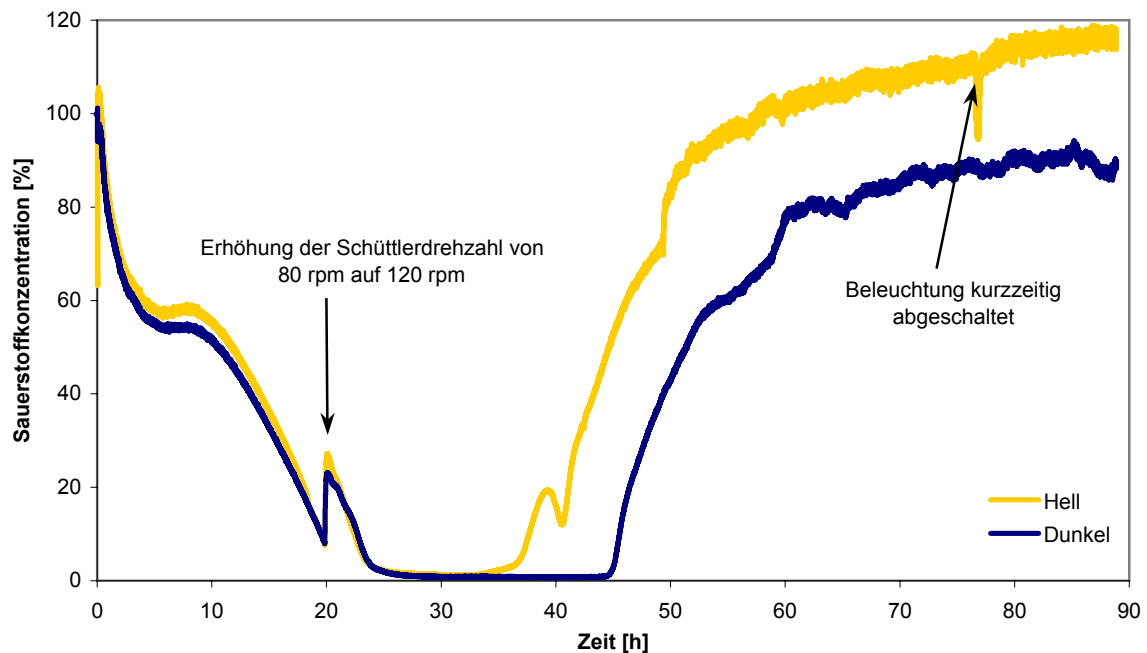


Abb. 4.37: In diesem Diagramm ist der zeitliche Verlauf zweier Kulturen von *Euglena gracilis* dargestellt, von denen eine unter heterotrophen Bedingungen, die andere unter fakultativ photoautotrophen Bedingungen wächst.

se werden Silikonkappen verwendet. Der Kolben, in dem die heterotrophe Kultur inkubiert werden soll, wird mit Alufolie soweit wie möglich lichtdicht umhüllt. Die Kolben werden in einem Certomat M mit Inkubationshaube Cerstomat S (beide von der Fa. Sartorius) kultiviert und mit einer Leuchtstofflampe mit 12 W Leistung beleuchtet. Die Schüttelgeschwindigkeit beträgt zu Beginn 80 rpm, später 120 rpm, die Temperatur beträgt 28 °C. Aus den Daten in Abbildung 4.37 geht hervor, dass *Euglena gracilis* in beiden Kulturen den heterotrophen

Stoffwechselpfad durchläuft. Die Kultur, die Licht ausgesetzt wird (Bezeichnet mit „Hell“) enthält nach 20 h auch Zellen, die eine grüne Färbung zeigen, folglich sich im photoautotrophen Stoffwechsel befinden. Als Resultat der Trübung durch die Zellen findet keine ausreichend Bestrahlung statt, um den gesamten Energiebedarf der Kultur durch Licht zu decken. Um die bestrahlbare Oberfläche zu vergrößern, wird die Schüttlerdrehzahl nach 20 h auf von 80 rpm auf 120 rpm gesteigert. Ein sichtbarer Effekt bleibt zunächst aus. Auf eine weitere Erhöhung der Drehzahl wird verzichtet, da *Euglena gracilis* empfindlich gegen Scherstress ist. Nach 35 h wird der Unterschied zwischen den beiden Kulturen auch in den Sauerstoffmessdaten sichtbar. Der Gelöstsauerstoffgehalt der Kultur mit photoautotrophen Zellen steigt ca. 10 h vor der heterotrophen Kultur an und übersteigt nach 58 h den Wert von 100 %. Um zu kontrollieren, ob das Licht die einzige Ursache für die unterschiedlichen Verläufe der Gelöstsauerstoffkonzentration ist, wird das Licht nach 76,5 h Kultivierungsdauer für einige Minuten abgeschaltet. Binnen 5 Minuten sinkt die Gelöstsauerstoffkonzentration von 111 % auf 95 % ab und liegt damit ca. 6 % oberhalb der Gelöstsauerstoffkonzentration der heterotrophen Kultur. Nach dem Wiedereinschalten des Lichts vergehen ca. 10 min, bis der Sauerstoffgehalt im Medium wieder den Wert von 110 % überschreitet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es mit der vorhandenen Ausrüstung lediglich möglich war, eine fakultativ photoautotrophe Kultur von *Euglena gracilis* anzuzüchten. Die aus der Unterbrechung der Lichtzufuhr resultierende Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration konnte präzise detektiert werden. Ein negativer Einfluss des Lichts auf die Messdaten, primär die Signalintensität, wurde nicht festgestellt. Auch eine Verfälschung der Daten durch Lichteinfall wurde nicht festgestellt.

4.2.2 Kultivierung von BA-D5 Hybridomzellen im Superspinner

Die Experimente dieses Kapitels wurden, ebenso wie die Charakterisierung des Superspinners gemeinsam mit Frau Dana Schiefelbein durchgeführt. Bei den BA-D5 Hybridoma-Zellen handelt es sich um Zellen, die aus der Fusion einer B-Lymphozytenzelle mit einer Myelomzelle, jeweils aus Mäusen isoliert, hervorgeht. Hybridomzellen werden kultiviert, um aus ihnen monoklonale Antikörper zu gewinnen. Vorteil dieser Methode gegenüber der Kultivierung von B-Lymphozyten ist, dass die Hybridomzellen unbegrenzt teilungsfähig sind [25]. Da die Zellen in Suspensionskultur kultiviert werden, soll untersucht werden, ob eine Kultivierung im Superspinner möglich ist. Darüber hinaus soll ermittelt werden, ob das neue System eine höhere Zelldichte erzeugt. Die Kultivierung erfolgt in DMEM-Medium mit Zusatz von 10 % NKS (die exakte Zusammensetzung ist im Anhang A.2 aufgeführt) bei einer Drehzahl von 40 rpm, 37 °C und Zusatz von 5 % CO₂ in der Zuluft für die pH-Wert-Kontrolle. Der Verlauf des Sauerstoffgehalts spiegelt die Stoffwechselaktivität der Kultur wieder. Die maximale Vitalität wird vor der maximalen Zellzahl erreicht. Eine deutlich höhere Zelldichte, wie in der Produkt-

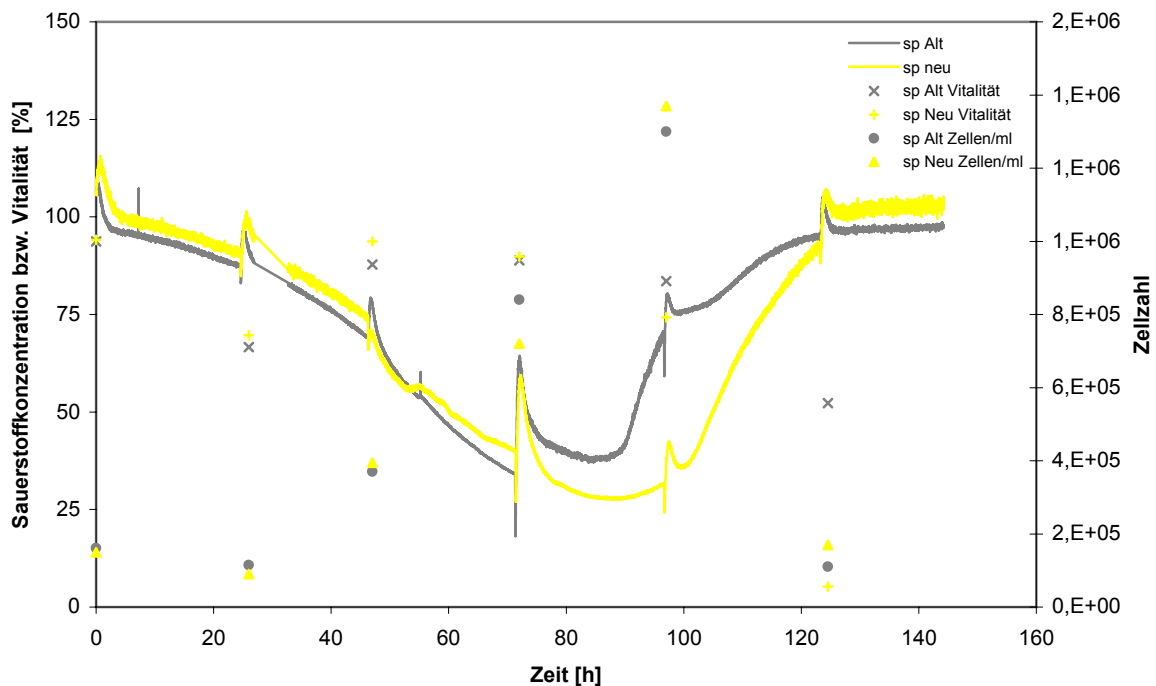


Abb. 4.38: Neben den Daten der Sauerstoffmessungen sind im Diagramm auch die Werte von Zellzahl und Vitalität einer Kultivierung mit dem alten Spinnersystem und dem neuen 5x2-System aufgeführt. Zu der Gelöstsauerstoffkonzentration von über 100 % kommt es durch eine Druckbeaufschlagung des Kopfraums. Dies ist notwendig um Blasenbildung an den Membranen zu verhindern.

information zum Superspinner beschrieben, kann für Hybridomzellen nicht bestätigt werden. Die Vitalität der Zellen in beiden Systemen ist zunächst, im Rahmen der Messungenauigkeit, identisch. In den Proben, die nach 97 h und 124 h entnommen wurden, werden für das neue 5x2-System geringere Werte für die Vitalität ermittelt als beim alten System. Auch nach Modifikation der Kulturbedingungen [41] werden keine signifikanten Erhöhungen von Vitalität und Zellzahl festgestellt. Im Verlauf des Sauerstoffgehalts sind zu Beginn sowie nach 24 h, 47 h, 72 h, 97 h und 124 h Peaks zu erkennen. Sie sind das Resultat von Probenahmen. Zunächst sinkt der Sauerstoffgehalt nach dem Abschalten von Rührer und Pumpe. Durch die Entnahme der Flaschen aus dem Inkubator wird der CO_2 -Gehalt im Inkubator herabgesetzt, der pH-Wert des Mediums verändert und der Zellstoffwechsel inhibiert. Hieraus resultiert jeweils der Anstieg der Sauerstoffkonzentration gefolgt von einem exponentiellen Abfall, innerhalb der sich die Kulturparameter wieder auf das Maß vor der Probenahme einstellen. Die Sauerstoffversorgung der Zellen durch den neuen Superspinner ist bis zu dem Zeitpunkt 70 h nach dem Animpfen besser als beim alten System. Danach ist der Sauerstoffgehalt in der Kultur im alten System deutlich höher.

Als Fazit dieses Abschnitts kann zusammengefasst werden, dass die Probenahme aus dem Superspinner den Stoffwechsel der Zellen deutlich beeinflusst und somit aus einer beprobten

Kultur kein direkter Rückschluss auf unbeprobte Kulturen möglich ist. Der Superspinner kann die aus der Produktinformation entnommenen Leistungsdaten bezüglich der Zellzahl bei Hybridomzellen nicht erfüllen. Gegenüber dem Vorgängersystem ist für Zellzahl und Vitalität eine Verschlechterung zu beobachten. Die Sauerstoffmessung unter dem erhöhten CO₂-Gehalt war nach einer Kalibration auf die entsprechenden Sauerstoffwerte unproblematisch.

4.2.3 Kultivierungen im Bioreaktor

In diesem Kapitel sollen, wie bereits im Kapitel 4.2.1, die Einsatzmöglichkeiten der optischen Sonde bei der Kultivierung unterschiedlicher Organismen untersucht werden. Die Messdaten sollen den Daten, die mit einer herkömmlichen Clark-Elektrode gemessen wurden, gegenübergestellt werden, um die Langzeitstabilität und den Einfluss von Störfaktoren auf das jeweilige System zu untersuchen.

Um das optische System in Bioreaktoren verwenden zu können, werden in Zusammenarbeit mit der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie drei Adapter für das Messsystem entwickelt, die eine Fixierung von Farbstoffpad und Lichtleiter an Bioreaktoren ermöglichen. Die Adapter werden in ihren Dimensionen den Clark-Elektroden der Fa. Mettler Toledo, Baureihe InPro 6000 nachempfunden. Es wird je ein Adapter der Baulänge 130 mm, 230 mm und 330 mm hergestellt. Ein Einfluss des jeweiligen Adapters auf die Messergebnisse ist nicht zu erwarten, da hierdurch kein Eingriff in den Strahlengang des Lichts erfolgt.

4.2.3.1 Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* im Bioreaktor als Repeated-Batch-Kultur

Bei dieser Kultivierung wird der Bioreaktor, im vorliegenden Fall ein Biostat B Reaktor mit 2 L Arbeitsvolumen, nachdem das Substrat abgebaut wurde, bis auf einen Rest von 100 mL entleert und mit neuem, sterilem Medium befüllt. Die im Reaktor verbliebene Biomasse stellt das Inoculum für die folgende Kultur dar. Die Kultivierung wird bei 30 °C mit YPD-Medium durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang A.2 aufgeführt. Die Rührerdrehzahl beträgt 1000 rpm, die Begasungsrate 2 vvm. Eine pH-Wert-Kontrolle wird nicht vorgenommen. Aus den Daten in Abbildung 4.39 auf der folgenden Seite ist ersichtlich, dass die Messwerte der Sonden während der Kultivierung deutlich auseinander driften. Da ein Absinken der Biomasse im Verlauf mehrerer Durchgänge nicht zu erwarten ist, ist von einer Fehlmessung der Elektrode auszugehen. Ein weiteres Indiz für eine Fehlfunktion der Elektrode ist der Anstieg des pO₂-Werts auf 120 %. Die in Kapitel 4.2.1.1 erwähnten Peaks, die aus dem Abbau von Ethanol und Acetat resultieren, sind aufgrund des hohen Sauerstoffeintrags in den Bioreaktor nicht anhand des Verlaufs der Gelöstsauerstoffkonzentration zu erkennen.

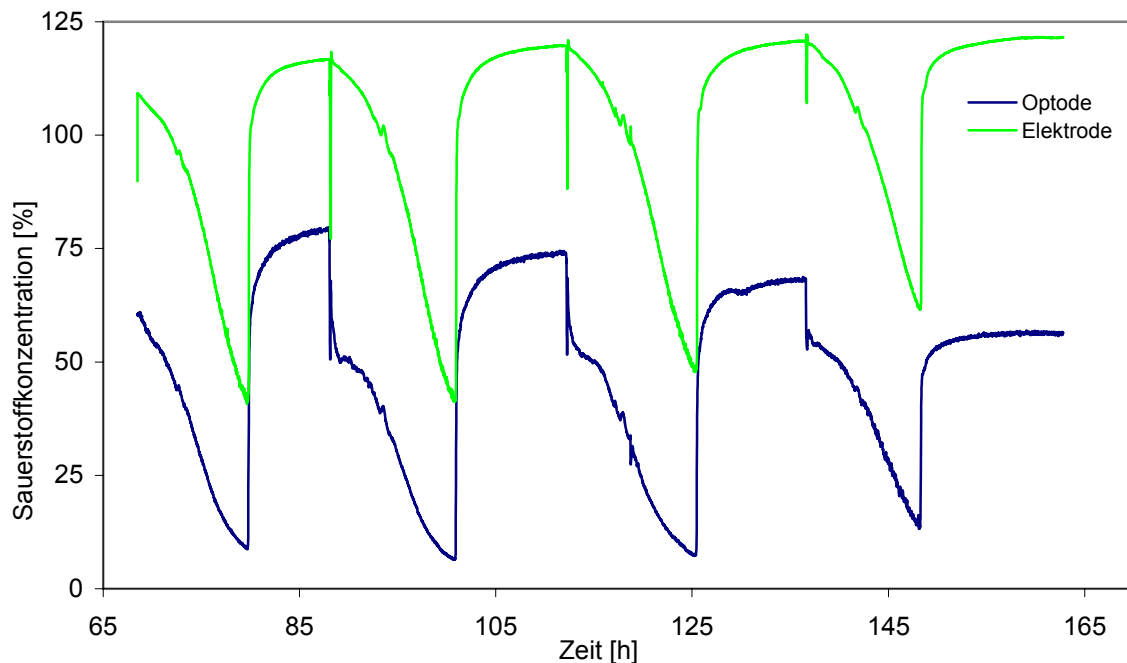


Abb. 4.39: Darstellung einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*, die als Repeated-Batch durchgeführt wurde. Das Diagramm zeigt einen Ausschnitt des Gesamtexperiments.

4.2.3.2 Kultivierungen des *Corynebacterium glutamicum* im Bioreaktor

Um Aufschluss über die Präzision der Sonden zu erlangen wird ein weiteres Experiment mit dem *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt. Dies geschah in Kooperation mit Michael Büring im Rahmen seiner Diplomarbeit [9].

Corynebakterien werden in der Biotechnologie zur Produktion von Aminosäuren kultiviert. Der verwendete Stamm sekretiert Serin in das Medium [9]. Kultiviert wird *Corynebacterium glutamicum* in einem synthetischen Medium, dessen Zusammensetzung im Anhang A.2 aufgeführt ist. Den Zellen steht in diesem Medium ausschließlich Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Die Kultivierung wird in einem Biostat B Reaktor (Fa. Sartorius) durchgeführt.

Die Sauerstoffbindung für den Energiestoffwechsel erfolgt über die Atmungskette. In die Atmungskette sind Enzyme involviert, in deren aktiven Zentren Eisenionen fixiert sind. Durch eine Maskierung dieser Ionen kann die Sauerstoffaufnahme über die Atmungskette unterbrochen werden, was einen abrupten Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration zur Folge hat. In Abbildung 4.40 auf der folgenden Seite ist zu erkennen, dass die gemessenen Sauerstoffkonzentrationen von Optode und Elektrode umeinander schwanken. Nachdem das Substrat nach 34 h vollständig abgebaut ist, kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Sauerstoffkonzentration und zu erheblicher Schaumbildung. Dieser Schaum steigt in die Abgasleitung und verursacht durch den resultierenden Druckanstieg einen Anstieg der Sauerstoffkonzen-

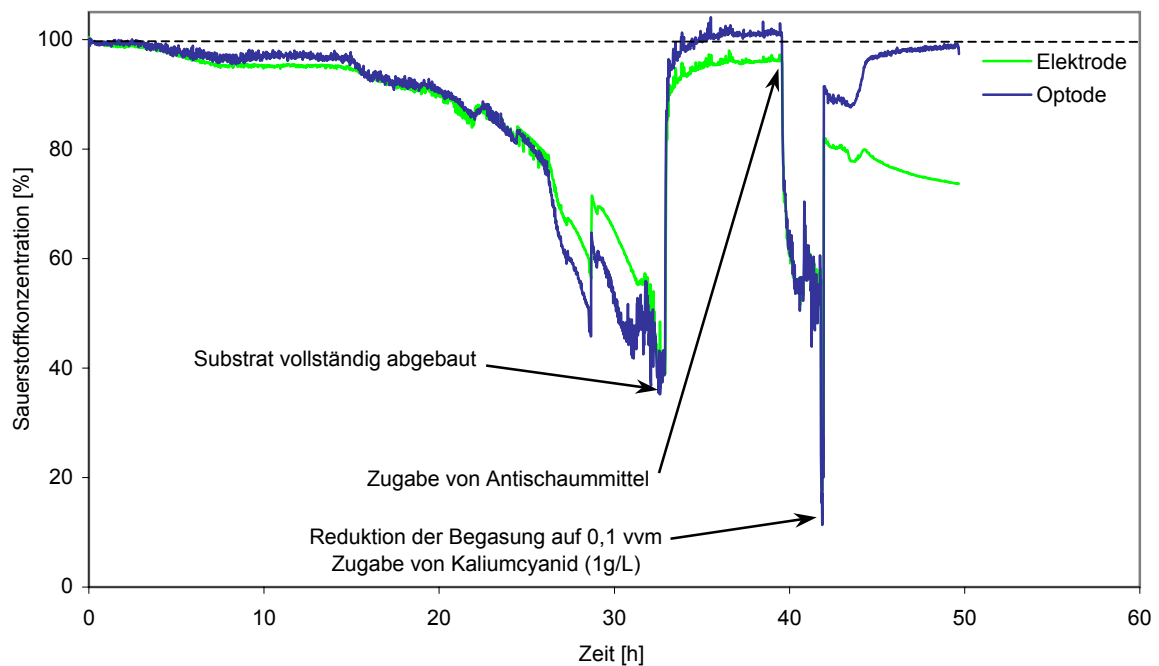


Abb. 4.40: In diesem Diagramm sind die Verläufe der Sauerstoffkonzentration, die während einer Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* mit Hilfe einer Clarkelektrode und der Optode gemessen wurden. Nach 43 h wurde der Kultur Kaliumcyanid zugefügt, um die Sauerstoffaufnahme über die Atmungskette zu unterbrechen.

tration über die vollständige Sättigung hinaus. Durch Zugabe von Desmophen (Fa. Bayer) als Antischaummittel kommt es wieder zu einer Abnahme des Sauerstoffgehalts im Medium. Nach 43 h wird die Begasung auf 0,2 L/min herunter geregelt und Kaliumcyanid bis zu einer Endkonzentration von 1 g/L im Medium zugesetzt. Es resultiert ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration. Bis sich bei der Optode ein konstanter Wert einstellt, vergehen mehrere Stunden. Der Endwert liegt mit 99 % unterhalb des Anfangswertes. Während der Kultivierung änderte sich die Wetterlage und somit der Luftdruck [54]. Dieser sank um ca. 1 %. Es kann festgestellt werden, dass mit der Optode präzise Daten gemessen werden. Zu einer Drift ist es nicht gekommen. Die Messwerte der Elektrode steigen nach der Cyanidzugabe auf ein Maximum und sinken dann kontinuierlich. Nach Angaben der Herstellerfirma Mettler-Toledo kommt es zu einer Fehlmessung der Elektrode durch die Cyanidzugabe. Die Cyanidionen können durch die Teflonmembran der Elektrode diffundieren und zur Referenzelektrode, einer Silber/Silberchlorid-Elektrode gelangen. Da das Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid den Wert $2 \cdot 10^{-10}$ hat, das Dicyanoargentat-Ion, das sich aus Silberkationen in Gegenwart von Cyanid bildet, eine Komplexbildungskonstante von ca. 10^{21} aufweist [36], ist von einer Verschiebung der Gleichgewichtskonzentrationen an der Referenzelektrode und somit von einer Drift der Messwerte auszugehen. Eine Substitution des Ruthenium-Komplexes wurde nicht weiter gehend untersucht, da sie aufgrund der Ligandenstruktur nicht zu erwarten ist und

aus den Messdaten kein Indiz auf eine solche Reaktion im beobachteten Zeitraum abgeleitet werden konnte.

4.2.3.3 Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum* im Bioreaktor

Im Rahmen dieser Kultivierung soll untersucht werden, ob die optische Sonde für Kultivierungen im Bioreaktor geeignet ist, die einem industriellen Produktionsprozess zur Gewinnung von Cephalosporin C nachempfunden sind. Das verwendete Medium enthält potenziell störende Substanzen wie Proteine, Stärke und Sojaöl. Die Kultivierung wird über 300 h in einem Biostat UD der Firma Sartorius durchgeführt. Nach 140 h wird in einem Repeated-Batch-Experiment neues Medium aufgefüllt. Die Temperatur beträgt zwischen den Kultivierungszeitpunkten 0 h und 35 h sowie zwischen 140 h und 190 h jeweils 28°C, im restlichen Zeitraum 25°C. Die Sauerstoffkonzentrationen von über 100 % resultieren aus einer Zusatzbegasung mit Sauerstoff und einer Druckbeaufschlagung des Reaktorkessels mit bis zu 1,2 bar. Eine detaillierte Beschreibung des Kultivierungsablaufes befindet sich im Kapitel 3.1.3. Aus den Daten in

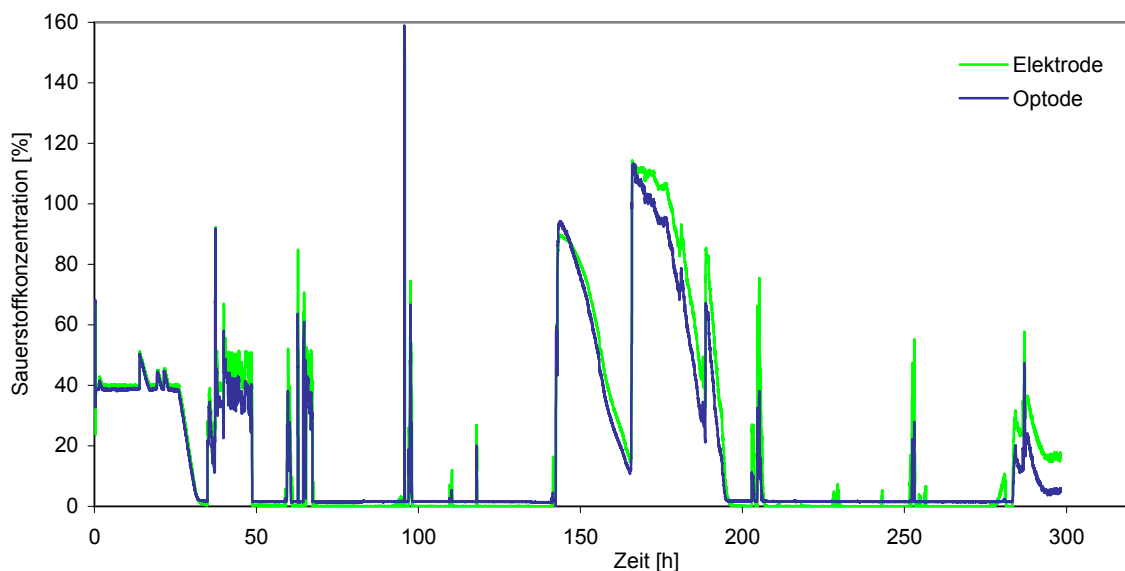


Abb. 4.41: Darstellung des mit Elektrode und Optode gemessenen Verlaufs der Sauerstoffkonzentration einer Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* im Bioreaktor.

Abbildung 4.41 geht hervor, dass die Daten der beiden Sonden den gleichen Verlauf nehmen. Die Basislinie der Optode liegt etwa bei 1,4 %, was verschiedene Ursachen (Kalibrationsfehler, Fehler bei der Temperaturkompensation etc.) haben kann. Eine Drift der Basislinie wird nicht beobachtet. Die Daten der Elektrode verlaufen bereits bei geringer Sauerstoffkonzentration oberhalb der Werte der Optode. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass Mediumkomponenten durch die Teflonmembran in den Elektrolyten eingedrungen sind. Nach einer Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* ist dieser bräunlich verfärbt und eingetrübt. Durch einen elektrolytischen Umsatz dieser Substanzen in der Elektrode ist eine Fehlmessung möglich. Die

Messungen der Optode werden durch die Mediumkomponenten nicht gestört. Während dieser Kultivierung, bei der die Messfrequenz mit 1/min gewählt wurde, werden ca. 17900 Datenpunkte erfasst. Die Amplitude des Messsignals sank während der Kultivierung von 11400 auf 7900 Einheiten für sauerstofffreies Medium ab. Ursache hierfür ist das Ausbleichen des Farbstoffes durch die Messung. Die Intensitätsabweichung beeinflusst die Sauerstoffmessung nicht. Die Lebenszeit der Fluoreszenz verändert sich durch die Amplitude des Signals im betrachteten Bereich nicht. Dies zeigt erneut die Vorzüge dieses Messverfahrens.

Ein Problem für den Einsatz der Optode entsteht aus den gängigen Reinigungsverfahren die bei Großfermentern angewendet werden. Diese basieren häufig auf dem Einwirken von heißen, basischen und aggressiven Reinigungsflüssigkeiten. Bei der Reinigung des Reaktors mit 3 %iger Mucasollösung, (Fa. Merz), einem Reiniger auf Tensid-Enzym-Basis, die aufgrund der Ablagerung von erheblichen Mengen von Medienkomponenten an den Reaktorwänden nach jeder Kultivierung notwendig war, kam es zur Ablösung des Farbstoffpads vom Quarzglasfenster. Der pH-Wert der Lösung variiert zwischen 9 und 10. Begünstigt wird die Abtrennung durch Temperaturen über 45 °C und durch Scherkräfte bei hoher Rührgeschwindigkeit. Zu einer Ablösung des Farbstoffpads während einer Kultivierung kam es sehr selten.

4.2.3.4 Bestimmung von charakteristischen Unterschieden zwischen den Sonden anhand der Kultivierungen von *Escherichia coli*, *Acremonium chrysogenum* und *Saccharomyces cerevisiae* im Bioreaktor

In diesem Kapitel werden die Datensätze von *Saccharomyces cerevisiae* aus Kapitel 4.2.3.1 und *Acremonium chrysogenum* aus dem Kapitel 4.2.3.3 sowie ein weiterer Datensatz einer Repeated-Batch-Kultivierung von *Escherichia coli*, die im Rahmen dieser Schrift nicht näher beschrieben werden soll, als Messwertpaare von Elektrode und Optode gegeneinander aufgetragen. Der ideale Verlauf eines Graphen verläuft mit einer Steigung von 1 durch den Ursprung. Einen ähnlichen Verlauf zeigen in Abbildung 4.42 auf der folgenden Seite nur die Daten der Kultivierung E.Coli von *Escherichia coli*. Der Verlauf der Daten ist linear, die Ausgleichsgerade einer linearen Regression hat eine Steigung von 1,03 bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,994. Die Steigung der Kurve Acrem. aus der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* ist geringer. Darüber hinaus steigen die Werte nicht linear, sondern mit einem Exponenten größer als 1. Die Daten streuen erheblich. Noch stärker weichen die Daten des Graphen Hefe aus der Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* vom idealen Verlauf ab. Zwischen 110 % und 125 % sind am oberen Rand des Graphen Stufen zu erkennen. Diese resultieren aus der Drift einer der Sonden. Dem Konzentrations-Zeit-Graphen (Abbildung 4.39 auf Seite 80) ist zu entnehmen, dass es sich hierbei um die Elektrode handelt. Darüber hinaus ist der exponentielle Verlauf der Messwerte noch deutlicher als in den Daten der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum*. Eine Näherung der Daten an den Ursprung ist nicht zu erkennen. Im Gegen-

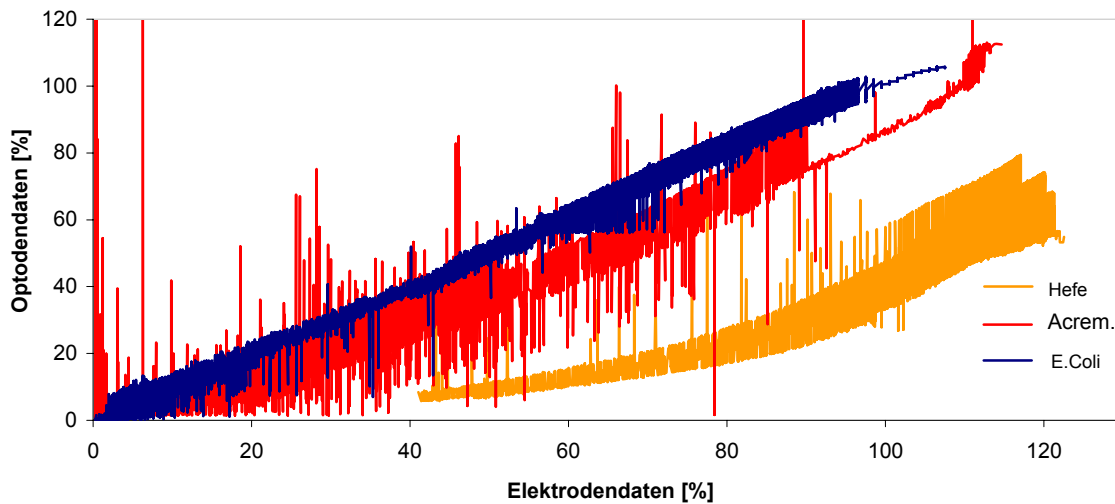


Abb. 4.42: Dieses Diagramm zeigt die Auftragung der Messwerte von Optode und Elektrode aus Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* und *Acremonium chrysogenum* gegeneinander.

satz zu den anderen beiden Kultivierung nimmt die Streuung der Daten mit zunehmendem Sauerstoffgehalt deutlich zu.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick der Sauerstoffmessungen

Anhand der Experimente mit der Sulfitmethode und der Stickstoffmethode konnte gezeigt werden, dass die Ansprechzeit des Messsystems für eine Anwendung in der Biotechnologie hinreichend kurz ist. Auch Präzision und Genauigkeit der Optode sind ebenso gut wie die der Elektrode. Im Vergleich zur Elektrode tendiert die Optode weniger zur Messwertdrift. Gegenüber der Clark-Elektrode ist die Optode schneller betriebsbereit und einfacher in der Handhabung. Nachteilig ist die begrenzte Lebensdauer der Optode, die für die beschriebenen Prozesse jedoch ausreichend war. Die chemische Beständigkeit gegenüber heißen, stark alkalischen Reinigungsmitteln, wie sie in der industriellen Produktion angewendet werden, kann zum Ablösen des Farbstoffpads führen. Hier sind Optimierungsprozesse vor der Serienproduktion dieser Optodenform notwendig. Gegenüber der Clark-Elektrode konnte anhand der Kultivierung mit den Corynebakterien und dem anschließenden Versuch mit Cyanid aber auch gezeigt werden, dass mit der Optode auch Messungen in Medien durchgeführt werden können, die mit der Elektrode nicht zugänglich sind. Zudem werden die Messungen der Optode durch Medienbestandteile weniger gestört, als bei der Elektrode, wie am Beispiel von *Acremonium chrysogenum* gezeigt wurde.

Bei der Betrachtung des Sauerstoffeintrags in Schüttelkolben wurde festgestellt, dass der $k_L a$ -Wert durch die Verwendung eines Kolbens größeren Volumens bei gleichem Füllvolumen steigt, der Anstieg des Sauerstoffgehalts bis auf den Ursprungswert wird hierdurch aber ebenso

verlängert. Darüber hinaus wird der Verlauf des Sauerstoffanstiegs auch erheblich durch den Kolbenverschluss beeinflusst. Es konnten drei maßgebliche Faktoren für die Geschwindigkeit des Sauerstoffeintrags gezeigt werden:

1. Der Diffusionswiderstand durch den Kolbenverschluss
2. Der Diffusionswiderstand durch den Gasraum des Kulturgefäßes
3. Der Widerstand beim Sauerstoffübergang durch die Phasengrenze.

Die Bewertung dieser Faktoren allein anhand des k_La -Werts, ermittelt durch die beschriebenen Experimente, ist nicht möglich. Eine weiter gehende Analyse kann beispielsweise durch die Bestimmung der Integralsumme erfolgen. Eine Alternative zur Messung des Sauerstoffeintrags kann durch die Etablierung eines Modellsystems geschaffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Ansatz für ein solches Modell entwickelt. Eine präzise Anpassung des Modells ist nur bei geringem Diffusionswiderstand möglich. Besonders die Übergänge von stationärer Sauerstoffkonzentration und Konzentrationssprung können noch optimiert werden. Dies kann beispielsweise durch Berücksichtigung einer Funktion geschehen, die die Änderung des Diffusionswiderstandes durch den Raum beschreibt. Für weitere Arbeiten besteht hier die Möglichkeit zur Anknüpfung.

Durch die Experimente mit den verschiedenen Schikanekolben konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Schikanen weniger entscheidend ist als die Form und die Betriebsbedingungen. Während bei niedriger Drehzahl die Schikanen mit großer Wirtktiefe den höchsten Sauerstoffeintrag erbringen, wirken die flachen Schikanen bei hoher Drehzahl effektiver. Ein Einflussfaktor, der im Rahmen dieser Arbeit noch nicht untersucht wurde, ist die Viskosität des Fluids. Auch hier kann in weiteren Arbeiten angesetzt werden. Erste Informationen könnten durch eine Simulation mit der Finite-Elemente-Methode gesammelt werden.

Die Auswahl eines Kolbens für ein Kultivierungsexperiment kann nicht ausschließlich am Sauerstoffeintrag ausgerichtet werden. Wie in den Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum* gezeigt werden konnte, kann die Morphologie der Zellen durch die Kolbenform beeinflusst werden. Auch der Sauerstoffbedarf der Kultur und die Tendenz zur Schaumbildung muss berücksichtigt werden. Das Gasvolumen stellt bei der Kultivierung nicht nur einen Diffusionswiderstand dar, sondern fungiert auch als Puffer, der kurzfristige Schwankungen im Sauerstoffumsatz dämpft. Bei der Kultivierung von Organismen, die sensibel gegenüber Schwankungen des Sauerstoffgehalts reagieren, kann dieser Effekt positiv auf die Kultur wirken. Die Beobachtung von kurzfristigen Schwankungen im Sauerstoffgehalt, bedingt durch Stoffwechseländerungen der Kultur (z.B. eine Diauxie), wird hierdurch erschwert. Als praxisingerechte Lösung kann für Standardkultivierungen in niederviskosem Medium ein Kolben mit 500 mL Nennvolumen und 100 mL Füllung betrachtet werden. Die Geometrie des Kolbens kann erst anhand des zu kultivierenden Organismus festgelegt werden.

5 Ergebnisse der Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum*

Sauerstoffeintrag und Sauerstofftransport im Medium stellen nur einen Teil der Versorgungsaufgabe dar. Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist der intrazelluläre Sauerstofftransport. Wie beispielsweise Klockow [24] ermittelt hat, kann es trotz ausreichendem Sauerstoffgehalt im Medium bei hoher Substratkonzentration zu anaeroben Stoffwechselprozessen kommen. Da der aerobe Stoffwechselpfad nur dann aktiv ist, wenn der anaerobe Stoffwechselpfad durch Sauerstoff inhibiert wird [6], kann gefolgert werden, dass es hier zu einer intrazellulären Sauerstofflimitierung des Stoffwechsels kommt.

Neben höheren Organismen bilden auch einige einzellige Organismen, wie das *Vitreoscilla*-Bakterium, Hämoglobine als Sauerstoff übertragendes Protein. Die Gensequenz des *Vitreoscilla* Hämoglobins (VHb) ist bekannt. Daher ist es möglich, diese in andere Organismen wie *Acremonium chrysogenum* zu integrieren. Von einer Optimierung des intrazellulären Sauerstofftransports bei *Acremonium chrysogenum* erhofft man eine Ausbeuteerhöhung der Cephalosporin-C-Produktion.

5.1 Vorkulturen im Bioreaktor

In den Vorkulturen der einzelnen Stämme wurden keine stammspezifischen Unterschiede festgestellt. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit nur je eine Vorkultur einer Kultivierung mit dem Basisstamm dargestellt werden. Der genaue Ablauf der Kultivierungen ist im Kapitel 3 beschrieben.

Wie aus Abbildung 5.1 auf der folgenden Seite hervorgeht, nimmt der pH-Wert einen für die Vorkultur charakteristischen Verlauf mit einem Maximum von 7,75 nach 55 h, gefolgt von einem Minimum von 6,2 nach 73 h und einem erneuten Anstieg bis zum Zeitpunkt des Überimpfens. Das Minimum des pH-Wertes korreliert mit einem Anstieg des pO_2 -Werts. Dies ist ein Anzeichen für eine Diauxie, die zu diesem Zeitpunkt durchlaufen wird. Nach 85 h ist erneut ein Minimum des pO_2 -Werts und des pH-Werts zu erkennen, was auf eine erneute Stoffwechselumstellung hindeutet. Die Rührerdrehzahl wird dem aktuellen Sauerstoffbedarf der Kultur jeweils angepasst, um einen minimalen Scherstress einwirken zu lassen. Als Indikator für den Sauerstoffbedarf wird der Gelöstsauerstoffgehalt angenommen. Durch den mehrmaligen Wechsel der Rührerdrehzahl ist es nicht möglich, eindeutige Zusammenhänge zum Kohlendioxidgehalt der Abluft zu finden. In den offline bestimmten Parametern, die in Abbildung 5.2 auf Seite 88 zusammengefasst sind, ist zu erkennen, dass Glucose und Lactat im Verlauf der Kultivierung quantitativ umgesetzt worden sind. Im Gegensatz hierzu sinkt die Phosphatkonzentration bereits nach der Hälfte der Kultivierungsdauer auf einen konstant niedrigen Wert. Auch ist hier eine exponentielle Abnahme der Phosphatkonzentration zu beob-

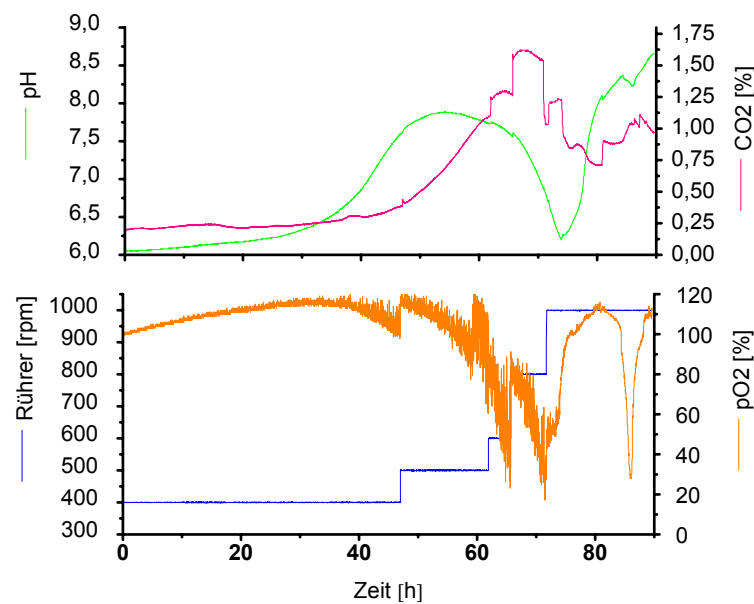


Abb. 5.1: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der mit der RISP-Software aufgezeichneten Daten von pH-Wert, Gelöstsauerstoffgehalt, Kohlendioxidgehalt der Abluft und Rührerdrehzahl aus der ersten Reaktorstufe

achten. Die Konzentrationen von Glucose und Lactat nehmen nahezu linear ab. Die Ursache für diese unterschiedlichen Verläufe besteht darin, dass neben Glucose und Lactat weitere Kohlenstoff- und Energiequellen verfügbar sind. Bei anderen Kultivierungen konnte teilweise auch ein Anstieg der Glucosekonzentration beobachtet werden, der durch das Sekretieren von Glucose als Abbauprodukt von Oligo- bzw. Polysacchariden auftritt. Eine Bildung von CPC in der ersten Reaktorstufe wird nicht bei allen durchgeführten Kultivierungen beobachtet. Hier durchläuft die CPC-Konzentration etwa nach der Hälfte der Kultivierungsdauer ein Maximum von 0,3 g/L. Die nächste Reaktorstufe wird unter identischen Bedingungen wie die ersten Reaktorstufe durchgeführt. Ein ähnlicher Verlauf der Daten kann daher erwartet werden. Zunächst kommt es jedoch, wie aus den in Abbildung 5.3 auf Seite 89 dargestellten Werten hervor geht, zu einer Lag-Phase, die mehr als 100 h andauert. Während dieser Zeit ist die Bildung von Zellpellets zu beobachten. Abbildung 5.4 auf Seite 89 Teil A zeigt ein Zellpellet mit einer Ausdehnung von etwa 0,5 mm-1 mm. Die Bildung von Pellets ist besonders bei Kultivierungen mit langer Lag-Phase ausgeprägt. Ob sie Ursache oder Folge ist, konnte nicht ermittelt werden. Im Verlauf der Kultivierung wird stets eine Auflösung der Pellets beobachtet. Eine Struktur, wie sie in Abbildung 5.4 auf Seite 89 Teil B dargestellt ist, bildet sich. Gegenüber dem Biostat B-Reaktor, der für die erste Vorkulturstufe verwendet wird, besteht beim Biostat C die Möglichkeit, das Fluoreszenzspektrophotometer BioView-Sensor (Fa. Delta light & optics) über einen 25 mm-Standardport zu installieren. Ausgewählte Daten, die mit diesem System ermittelt wurden, sind in Abbildung 5.5 auf Seite 90 dargestellt. Der

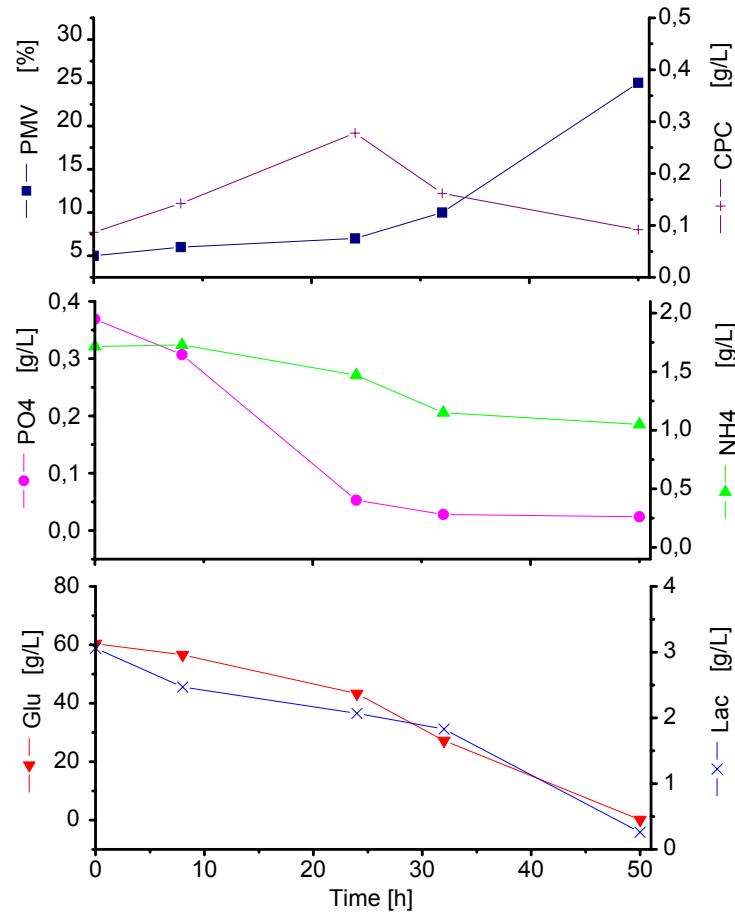


Abb. 5.2: Darstellung der offline bestimmten Kulturparameter aus der ersten Reaktorstufe

Verlauf der Messwerte der Aminosäurefluoreszenz resultiert aus einer Änderungen der Proteinkonzentration, was wiederum auf Änderungen der Biomasse hindeutet. Dominiert wird die Fluoreszenz der Aminosäuren von der Tryptophanfluoreszenz, da Tryptophan die einzige Aminosäure in biologischen Systemen ist, die messbare Fluoreszenz zeigt, wenn sie in Proteine eingebunden ist [56]. Aus dem Verlauf der Messwerte ist zu folgern, dass es zu Beginn der Kultivierungsstufe, bevor die Zellen in die Lag-Phase übergehen, zum Anwachsen der Biomasse kommt. Der Verlauf von pH- und pO_2 -Wert in Abbildung 5.3 auf der folgenden Seite zu Beginn der Kultivierung lässt ebenfalls auf eine geringfügige Stoffwechselaktivität schließen. Die Erhöhung der Konzentrationen von NADH und Flavinen, die aus der Biomassezunahme zu Beginn der Kultivierung resultiert, ist den Kurven nur bei Vergrößerung zu entnehmen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung steigen die Intensitäten der NADH- und der Flavinfluoreszenz deutlich an. Die Diauxie, die nach 230 h anhand der Daten in Abbildung 5.3 auf der folgenden Seite festgestellt wurde, ist auch in den Intensitätsverläufen der Fluoreszenz von NADH, Flavinen und am Messpunkt Ex 270 nm/Em 430 nm zu erkennen. Aus der Aminosäurefluoreszenz ist die Diauxie nicht zu entnehmen. Der Grund für diesen Unterschied liegt

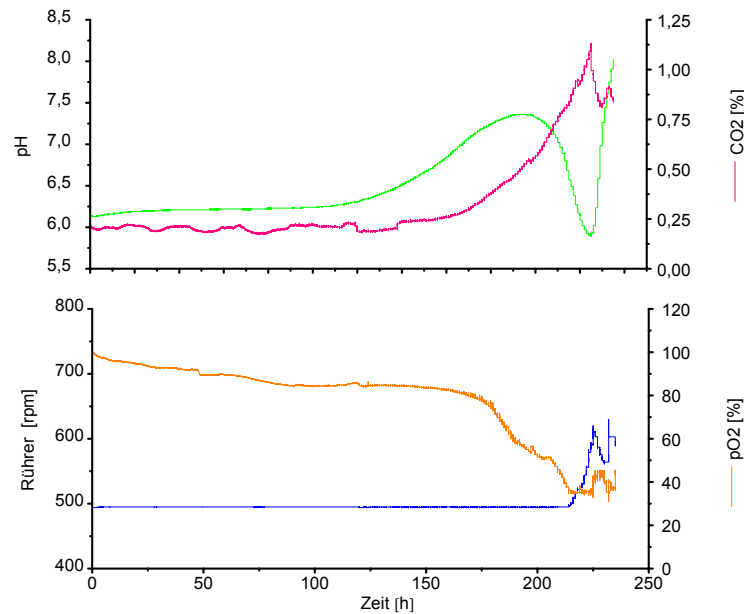


Abb. 5.3: Diagramm der online aufgezeichneten Daten der 2. Reaktorstufe der Kultivierung

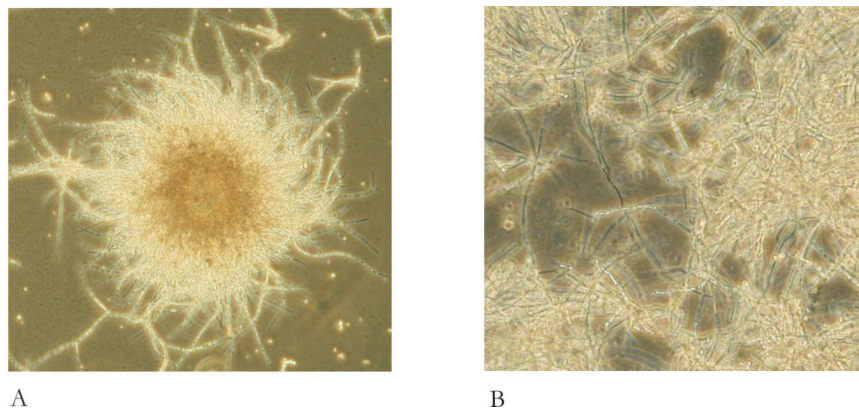


Abb. 5.4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Acremonium chrysogenum* bei 200facher Vergrößerung nach 50 h Kultivierungsdauer und nach 220 h Kultivierungsdauer

in den verschiedenen Funktionen der Fluorophore NADH und Flavinen einerseits bzw. den Aminosäuren andererseits. Der Anstieg der Aminosäurefluoreszenz als Resultat des Anstiegs der Proteinmenge, korreliert mit der Biomasse. Die Fluoreszenz der Aminosäuren ist dabei nicht unmittelbar an die Stoffwechselaktivität der Zellen gekoppelt. Dies steht im Gegensatz zu den Metaboliten NADH und Flavinen, die durch Stoffwechselvorgänge reduziert bzw. oxidiert werden können. Bei NADH fluoresziert lediglich die reduzierte, bei den Flavinen jeweils die oxidierte Form [30]. Durch Substratmangel, der eine Diauxie erzwingt, werden weniger Flavine in der oxidierten und NADH in der reduzierten Form benötigt, was zu einem verminderten Umsatz dieser Metabolite führt. Im Gegensatz zu NADH werden Flavine nicht

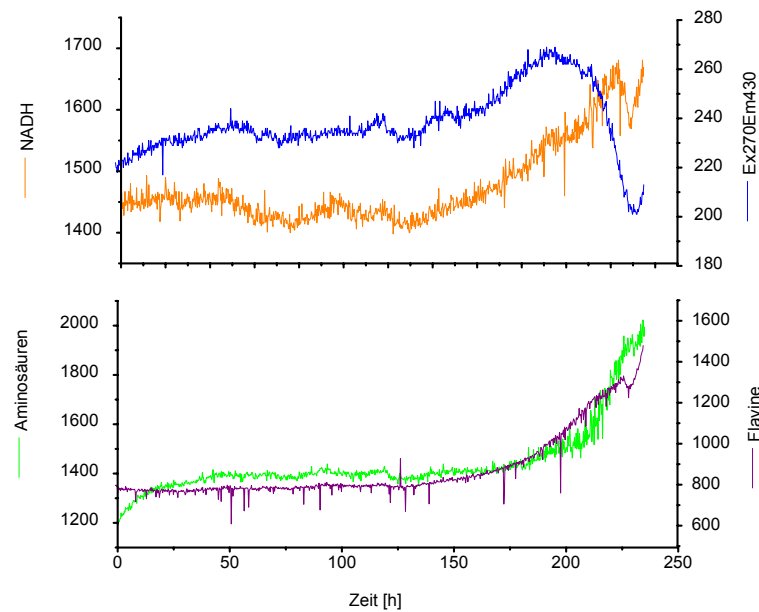


Abb. 5.5: Darstellung ausgewählter Fluoreszenzmesswerte aus der 2.Reaktorvorkultur. Gezeigt sind die zeitlichen Intensitätsverläufe von NADH, Flavinen, Aminosäuren und des Wellenlängenpaars Ex 270 nm/Em 430 nm

zwingend für den Energiestoffwechsel benötigt. Neben der Fluoreszenz von NADH, Flavinen und Aminosäuren sind weitere Bereiche für das Fluoreszenz-Monitoring von Bedeutung. Die Fluoreszenzintensität des Messpunkt Ex 270 nm/Em 430 nm entsteht nicht aus einem Fluorophor, sondern durch Überlagerung der Fluoreszenz mehrerer Fluorophore. Zu Beginn der Kultivierung wird der Anstieg der Biomasse wiedergegeben. Nach ca. 190 h wird ein Maximum durchlaufen, das in den anderen Intensitätsverläufen nicht wiedergefunden wird. Das folgende Minimum ist ein Resultat der Diauxie, die in den Fluoreszenzintensitäten von NADH und Flavinen wiedergefunden wird.

Der direkte Vergleich von Fluoreszenzintensitäten verschiedener Kultivierungen ist mit diesem Medium nicht möglich. Lediglich ein Vergleich des grundsätzlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensität ist möglich. Die Ursache hier für ist die Verwendung von Naturprodukten. Jede Charge der Mediumkomponenten, die ohne Reinigungsprozess aus einem Naturprodukt hergestellt wurde, weicht in ihren Eigenschaften erheblich von den anderen ab. Darüber hinaus ist es nicht möglich, die Veränderung der Eigenschaften des Mediums durch das Autoklavieren zu reproduzieren. Dies beeinflusst insbesondere sensible Messtechniken, wie die Fluoreszenzspektroskopie. Die Offline-Daten zu dieser Reaktorvorkultur sind in Abbildung 5.6 auf der folgenden Seite zusammengefasst. Berücksichtigt man den Messfehler, der bei der Ermittlung des Patched Mycel Volumes-Werts (PMV-Wert) angenommen werden kann (s. Anhang A.1), korrelieren die Werte mit der Biotrockenmasse. Aus der Messkurve der Biotrockenmasse ist

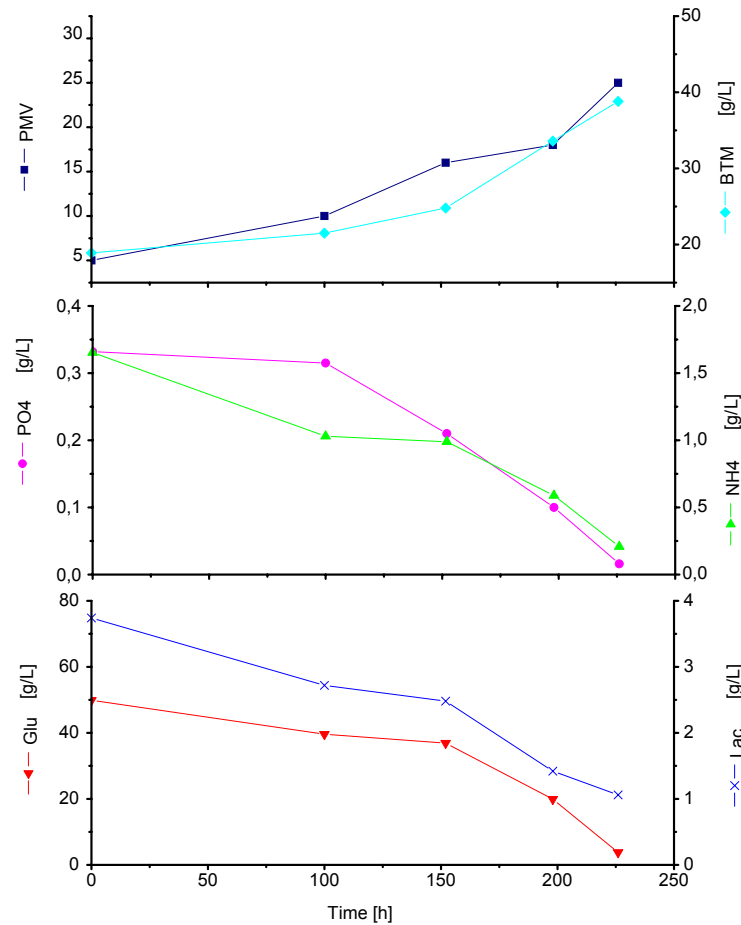


Abb. 5.6: Darstellung der Offline-Daten aus der 2. Reaktorvorkultur. Da in dieser Kultivierungsstufe kein CPC gebildet wurde, wird die Biotrockenmasse in die Darstellung einbezogen.

das exponentielle Wachstum zu erkennen. Phosphat und Ammonium werden während der Kultivierung quantitativ umgesetzt. Hinweise auf exponentielles Wachstum wie bei der Biomassebestimmung und den Daten aus den Abbildungen 5.3 auf Seite 89 und 5.5 auf der vorigen Seite werden nicht gefunden. Lactat wird nicht vollständig abgebaut. Es verbleibt ein Rest von ca. 1 g/L im Medium. Die Abnahme der Lactatkonzentration erfolgt annähernd linear. Die Glucosekonzentration korreliert mit dem exponentiellen Wachstum der Kultur. Es kann gefolgert werden, dass Glucose als primäres Substrat umgesetzt wird.

5.2 Kultivierung des Basisstammes ohne das Genkonstrukt für die Produktion des *Vitreoscilla*-Hämoglobins

Wie bei der Beschreibung der Vorkulturen sollen auch hier zuerst die Daten, die mit der RISP-Software aufgezeichnet wurden, dargestellt werden. Abbildung 5.7 auf der folgenden Seite beinhaltet gegenüber der äquivalenten Darstellung der Vorkulturdaten in Abbildung 5.1 auf Seite 87 zusätzlich die Parameter Base-, Glucose- und Ammoniumsulfatzugabe sowie die Be-

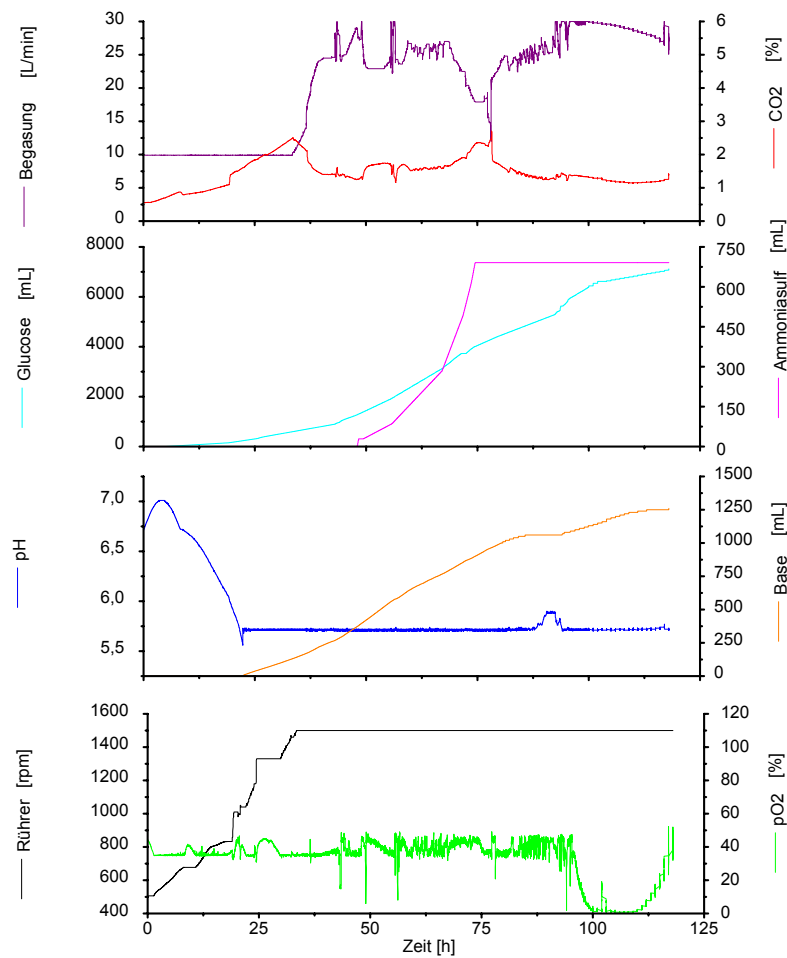


Abb. 5.7: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der mit der RISP-Software aufgezeichneten Daten aus der Produktionskultur. Da der Biostat UD für dieses Experiment nicht zur Verfügung stand, wurde ein Biostat C-Reaktor - baugleich mit dem Reaktor der vorhergehenden Vorkulturstufe - verwendet.

gasungsrate. Durch die Variation von Rührerdrehzahl und Begasungsrate wird der pO_2 -Wert auf 35 % eingestellt. Wie aus der Darstellung des pO_2 -Werts hervorgeht, ist die maximale Begasungsleistung des Reaktorsystems nicht ausreichend, um den Sauerstoffbedarf der Kultur zwischen 95 h und 105 h zu decken. Mit der pH-Wert-Regelung wird begonnen, wenn der pH-Wert 5,7 erreicht. Die Zellen sekretieren saure Metabolite, so dass nur Ammoniak-Lösung (10 %ig) zur pH-Wert-Regulierung beigegeben wird. Nach ca. 90 h steigt der pH-Wert kurzfristig an, was auf Stoffwechseländerungen bedingt durch Glucosemangel zurückzuführen ist. Zu dieser Zeit wird keine Ammoniak-Lösung benötigt. Der Verlauf der Ammoniumsulfatzugabe ist auf einen Fehler bei der Messung der Ammoniumkonzentration zurückzuführen. Zwischen 65 h und 74 h kommt es zu einer Überdosierung. Summiert man über die Flüssigkeitszugabe durch Ammoniumsulfatlösung, Amoniaklösung und Glucoselösung, so resultiert, dass während der Kultivierung ein Äquivalent des Kulturvolumens als Feedlösung zugegeben

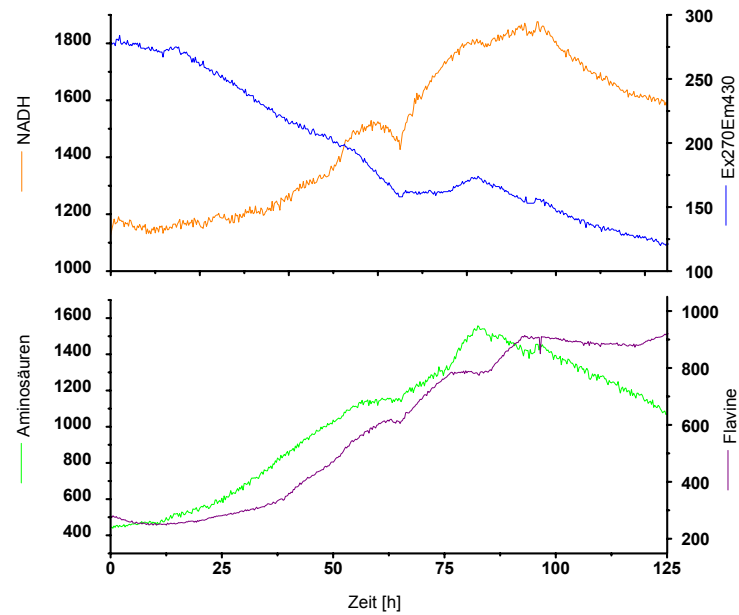


Abb. 5.8: Darstellung ausgewählter Fluoreszenzmesswerte aus der Produktionskultur. Gezeigt sind die zeitlichen Intensitätsverläufe von NADH, Flavinen, Aminosäuren und des Wellenlängenpaars Ex 270 nm/Em 430 nm

wird. Geht man von exponentiellem Wachstum aus, das im Verlauf der Kultivierung in eine stationäre Phase übergeht, in der der Zellstoffwechsel auf die Produktion von CPC fokussiert ist, ist zu erwarten, dass die Konzentration der Medienbestandteile, die nicht über die Feed-Lösungen zugeführt werden, abnimmt. Dies kann anhand der BioView-Daten in Abbildung 5.8 beobachtet werden. Zuerst beginnt die Konzentrationsabnahme der Proteine, wie an der Aminosäurefluoreszenz zu erkennen ist. Nach der Hungerphase bei 90 h nimmt auch die Konzentration von NADH und Flavinen ab. Die Fluoreszenzintensität des Messpunkts Ex 270 nm/Em 430 nm nimmt annähernd während der gesamten Kultivierung ab. Nach 60 h und nach 75 h sind im Fluoreszenzverlauf von Flavinen und NADH Unstetigkeiten zu erkennen. Sie sind Resultat einer Glucoseunterversorgung. In diesem Zeitraum decken die Zellen ihren Energiebedarf aus anderen Quellen, wie z.B. Stärke. Die Zeitpunkte, zu denen Glucosemangel herrscht, sind in Abbildung 5.9 auf der folgenden Seite nicht zu erkennen, da auf den Glucosemangel aus Kurztests geschlossen wird und durch Glucosezugabe sofort gegengesteuert wird. Ein weiteres Substrat, das Lactat, wird mit steigender Geschwindigkeit bis auf eine Konzentration von 1 g/L abgebaut. Nachdem die Konzentration unter diesen Wert gefallen ist, verlangsamt sich die Abbaugeschwindigkeit erheblich. Die Ammoniumkonzentration ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Durch Ammoniumsulfatzugabe kann die Konzentration gezielt gesteigert werden. Bei der pH-Wert-Regelung wird die Ammoniumkonzentration durch Amoniakzugabe erhöht. Darüber hinaus kann auch durch den Abbau von Proteinen

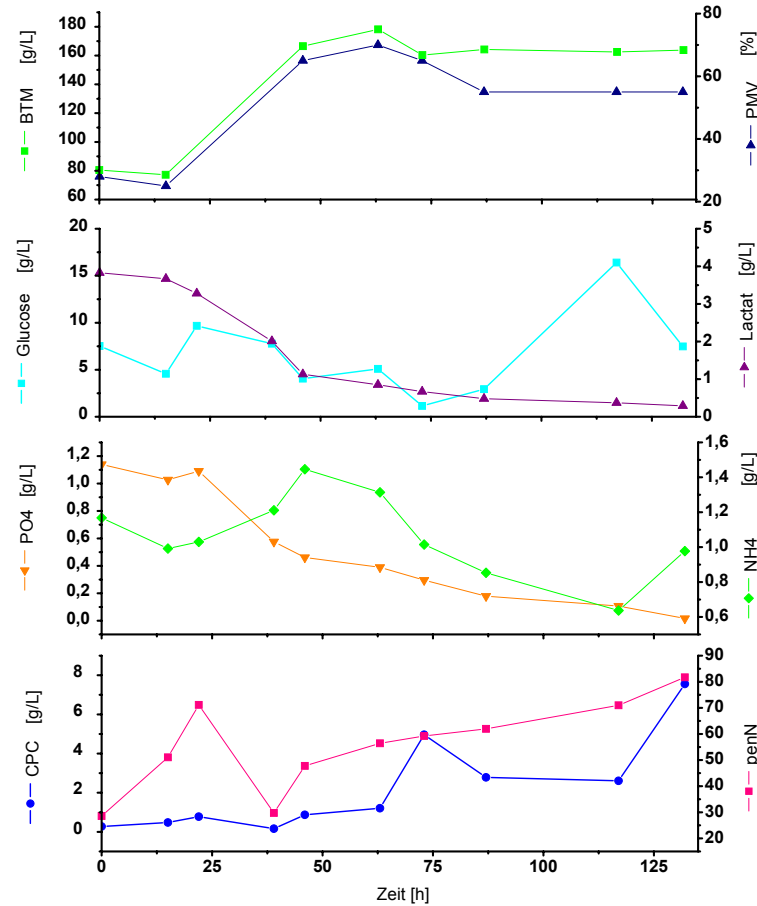


Abb. 5.9: Darstellung der offline bestimmten Konzentrationen von Biotrockenmasse, PMV, Glucose, Lactat, Phosphat, Ammonium, Penicillin N und Cephalosporin C. Die Konzentration des Penicillin N ist in relativen Einheiten angegeben.

Ammonium entstehen. Wie sich während der Kultivierung herausstellt, kommt es zur Störung des Ammoniumtests. Durch Medienbestandteile wird eine Konzentration unterhalb der gemessenen Konzentration suggeriert. Es kommt daher zu einer Fehldosierung. Der Verlauf der Phosphatkonzentration ähnelt der der Lactatkonzentration. Auch die Phosphatkonzentration wird nicht gesteuert. Die Biotrockenmasse und das Patched-Mycel-Volumen (PMV-Wert) verlaufen fast synchron, wodurch bestätigt wird, dass während der Produktionskultur eine Biomasseabschätzung anhand des PMV-Wertes möglich ist. Die Maximalwerte beider Parameter werden nach etwa 65 h bis 75 h erreicht. Danach übersteigt die Verdünnung durch die Feed-Lösungen die Wachstumsrate. Aus den Fluoreszenzdaten der Aminosäuren in Abbildung 5.8 auf der vorigen Seite ist zu erkennen, dass die Aminosäurekonzentration zunimmt. Ursache hierfür können beispielsweise Änderungen in der Zellmorphologie sein. Die CPC-Konzentration steigt innerhalb der ersten 24 h auf über 6 g/L an und nimmt in den folgenden Stunden wieder auf nahe 0 g/L ab. Die Ursache hierfür konnte basierend auf den bekannten Parametern nicht

ermittelt werden. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der CPC-Konzentration. Die Produktionsrate zwischen 50 h und dem Ende der Kultivierung beträgt 0,047 g/L·h, während sie innerhalb der ersten 24 h der Kultivierung bei 0,271 g/L·h liegt. Der letzte Wert ist vergleichbar mit den Messwerten, die Tollnick [49] im Reaktorsystem Biostat UD mit anderen Stämmen erreicht hat. Aufgrund der deutlich verringerten Produktionsrate ist von einer Inhibierung der CPC-Produktion auszugehen. Eine Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden. Da es nicht zu einer Akkumulation von Penicillin N (Pen N) kommt, kann von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung ausgegangen werden. Lediglich nach 75 h und am Ende der Kultivierung, wo es über wenige Stunden zu einer Sauerstoffunterversorgung kommt, werden in jeweils einem Messpunkt erhöhte Werte gemessen.

5.3 Kultivierung des modifizierten Stammes von *Acremonium chrysogenum* im Biostat C Standardrührkesselreaktor

In diesem Kapitel werden die Daten der Hauptkultur des Stammes von *Acremonium chrysogenum* mit dem Genkonstrukt aus dem *Vitreoscilla*-Bakterium dargestellt. Intention für dieses Experiment ist, eine vergleichbare Datenbasis zum Experiment mit dem unmodifizierten Stamm zu erhalten. Auf eine Präsentation der Vorkulturdaten wird verzichtet, da diese nicht wesentlich von den in Kapitel 5.1 gezeigten Daten abweichen. Die Kultivierung wird als Repeated-Batch-Experiment durchgeführt, um zu untersuchen, ob diese Art der Kultivierung Einfluss auf die Ausbeute nimmt. Beim Mediumwechsel nach 135 h werden 7,5 L Medium aus dem Reaktor abgelassen und dann über 5 h ca. 7,5 L frisches Medium aufgefüllt. Um den Gelöstsauerstoffgehalt oberhalb von 30 % einzustellen, ist eine Zudosierung von reinem Sauerstoff zur Druckluftbegasung notwendig. Eine Übersicht über die jeweilige Sauerstoffdosis gibt

Zeit	58 h	71 h	82 h	92 h	114 h	129 h
Sauerstoffvolumenstrom	3 L/min	3,5 L/min	5 L/min	2,5 L/min	2 L/min	0 L/min
Repeated-Batch						
Zeit	168 h	177 h	201 h	214 h	226 h	232 h
Sauerstoffvolumenstrom	1 L/min	2 L/min	5 L/min	4 L/min	5 L/min	2,5 L/min

Tab. 5.1: Änderungen der Sauerstoffdosierung während der Kultivierung des unmodifizierten Stammes

Tabelle 5.1. Bei der Beschreibung der Kultivierung sollen zunächst wieder die Online-Daten betrachtet werden. Die Daten sind in Abbildung 5.10 auf der folgenden Seite zusammengestellt. Anhand von Rührerdrehzahl und Begasungsrate ist zu erkennen, dass die Sauerstoffübertragung des Reaktors bei Druckluftbegasung nach 55 h nicht mehr ausreicht, um den Sauerstoffbedarf der Kultur zu decken. Durch Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Zuluft (nach Tabelle 5.1) wird die Sauerstoffübertragungsrate gesteigert. Der Sauerstoffbedarf

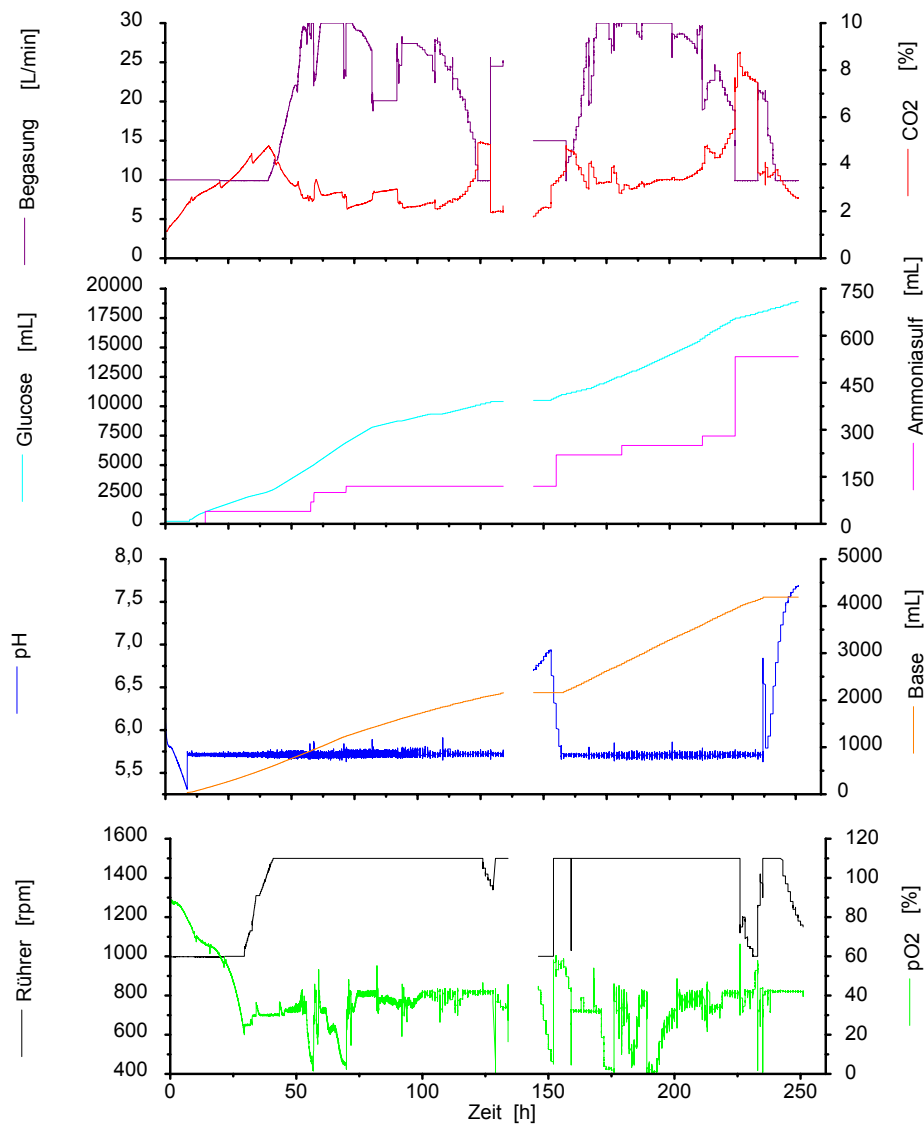


Abb. 5.10: Abbildung der online bestimmten Kulturparameter einer Kultivierung des genetisch modifizierten Organismus im Rührkesselreaktor. Die Lücke in den Daten zwischen 135 und 145 h resultiert aus dem Mediumwechsel.

der Kultur kann bis zum Ende der Kultivierung gedeckt werden. Durch die Schwankungen des Sauerstoffgehalts in der Zuluft und der Begasungsrate wird der Kohlendioxidgehalt der Abluft maßgeblich beeinflusst. Der Maximalwert der Kohlendioxidkonzentration wird nach 228 h bei 8,72 % erreicht. Auf die Stoffwechselaktivität der Kultur kann anhand des Glucoseumsatzes und des Baseverbrauchs geschlossen werden. Beide Messgrößen nehmen in jedem Schritt der Repeated-Batch einen S-förmigen Verlauf. Die Steigerung der Ammoniumzugabe erfolgt nach einer Probenahme stufenweise, wenn nach Offline-Analytik Indizien hierfür bestehen. Die pH-Wert-Regelung muss nach 240 h abgebrochen werden, da die zur Verfügung stehende

Menge Ammoniaklösung zu diesem Zeitpunkt aufgebraucht ist. Verglichen mit den Daten aus der Kultivierung des unmodifizierten Stammes ist ein gleichartiger Verlauf der Messdaten zu beobachten. Der Stoffwechsel des modifizierten Stammes ist höher als der des unmodifizierten. Erkennbar ist dies am höheren Glucose- und Basebedarf. Während bei der Kultivierung des unmodifizierten Stammes ein durchschnittlicher Glucoseverbrauch von 59,83 mL/h bestimmt wird, wird im ersten Teil dieses Kultivierungsexperiments ein Wert von 78,79 mL/h, im zweiten Teil von 81,73 mL/h erreicht. Ebenso verhält es sich mit dem Baseverbrauch. Für die Kultivierung des unmodifizierten Stammes wird ein durchschnittlicher Baseverbrauch von 10,58 mL/h bestimmt. Für die Repeated-Batch-Kultivierung wird ein Wert von 16,89 mL/h im ersten Teil und 19,61 mL im zweiten Teil ermittelt. Diese deutlichen Unterschiede lassen den Schluss zu, dass das Genkonstrukt Einfluss auf den Zellmetabolismus nimmt.

Die Fluoreszenzdaten dieser Kultivierung sind in Abbildung 5.11 aufgeführt. Bei der Betrachtung

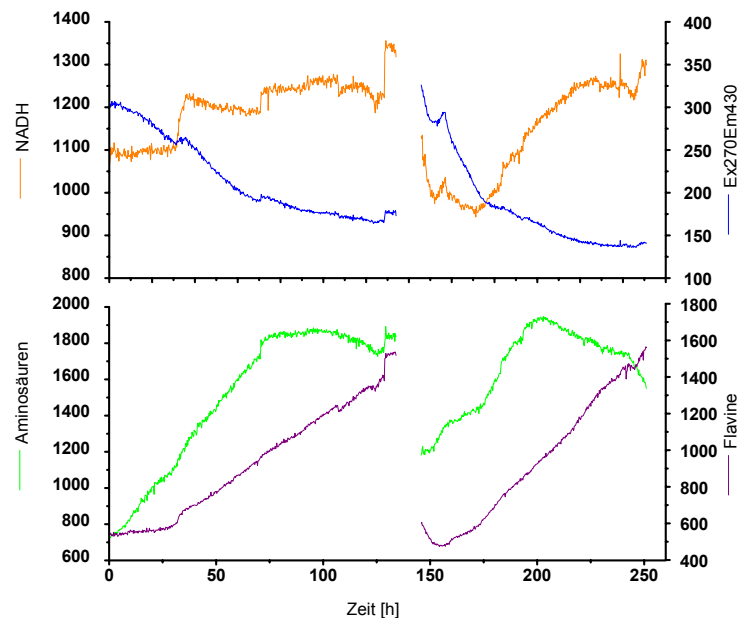


Abb. 5.11: Darstellung der Fluoreszenzdaten ausgewählter Fluorophore einer Kultivierung des genetisch modifizierten Organismus im Rührkesselreaktor.

tung der Daten fällt auf, dass der Verlauf der NADH-Fluoreszenz nicht reproduziert werden konnte. Im Verlauf der Fluoreszenzintensitäten der beiden Teilversuche sind bei den anderen aufgeführten Fluorophoren ähnliche Verläufe erkennbar. Eine Ursache für das abweichende Verhalten der NADH-Fluoreszenz kann nicht ermittelt werden. Möglicherweise sind Quench-Effekte hierfür verantwortlich. Die Fluoreszenz am Messpunkt Ex 270 nm/Em 430 nm zeigt eine ähnlichen Entwicklung wie die Fluoreszenz in der Kultivierung des unmodifizierten Stammes in Abbildung 5.8 auf Seite 93. Da die Glucoseversorgung im Repeated-Batch-Experiment besser gelingt, ist hier kein Plateau zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität der Flavine nimmt

einen näherungsweise linearen Verlauf. Lediglich zu Beginn der Kultivierung ist eine geringere Steigung zu beobachten. Im zweiten Telexperiment ist sowohl bei den Flavinen als auch bei NADH zunächst eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, wie sie auch in der Batchkultivierung des unmodifizierten Stammes festgestellt wird. Die Fluoreszenzintensität der Aminosäuren nimmt bei beiden Telexperimenten einen Verlauf, der mit der Kultivierung des unmodifizierten Stammes vergleichbar ist. Im zweiten Telexperiment ist der Anfangswert der Fluoreszenzintensität deutlich höher als im ersten. Ursache hierfür ist das höhere Inoculum. Bei 129 h ist eine Stufe in allen dargestellten Messpunkten zu beobachten. Bei NADH und Flavinen ist eine weitere Stufe bei 30 h und 129 h zu erkennen. Während dieser Zeiten wird die Begasungsrate deutlich gesteigert, was zu einem erhöhten Blasenanteil im Medium und einer verstärkten Lichtstreuung führt. Aus den Offline-Daten in Abbildung 5.12 ist die

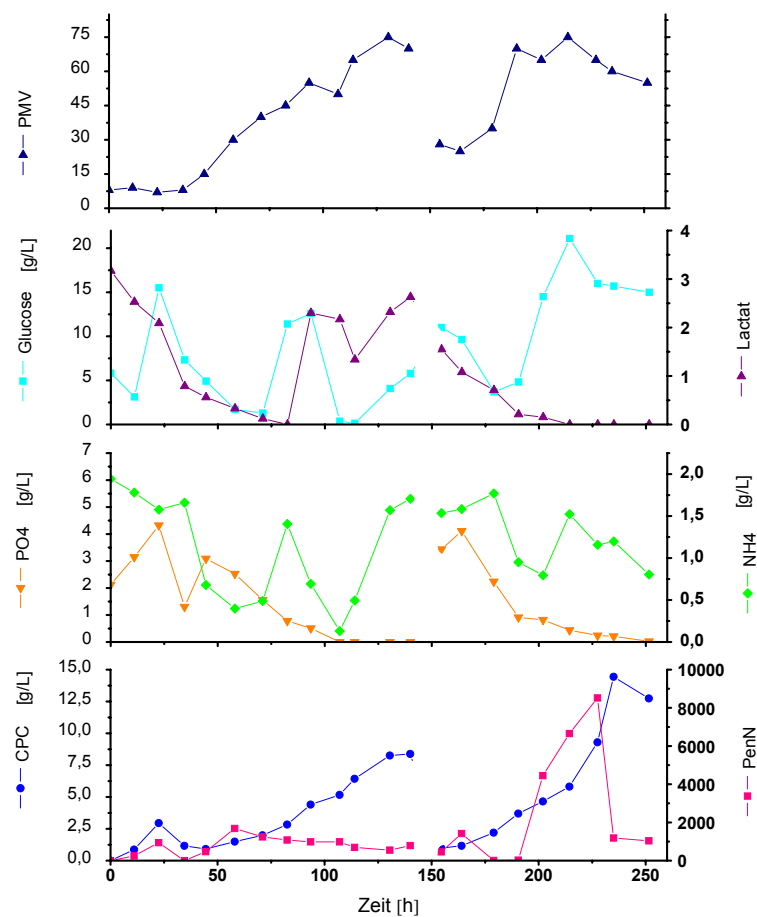


Abb. 5.12: Übersicht über die offline bestimmten Parameter der Repeated-Batch-Kultivierung des genetisch modifizierten Stammes.

größere Biomasse, die als Inoculum für den zweiten Teil des Experiments verwendet, wird anhand des PMV-Werts erkennbar. Daneben steigt der PMV-Wert im zweiten Telexperiment schneller als im ersten. Dieser Befund wird durch den erhöhten Glucose- und Baseverbrauch

(Abbildung 5.10 auf Seite 96) sowie durch die größere Steigung der Fluoreszenzintensität der Flavine, zeitweise auch der Aminosäuren, bestätigt (Abbildung 5.11 auf Seite 97). Die Glucosekonzentration ist starken Schwankungen unterworfen, es kommt aber nicht zum Substratmangel, wie anhand der Online- und Fluoreszenzdaten bestätigt wird. Nach 90 h wird ein Anstieg des Lactatgehalts im Medium beobachtet. Dieses konnte in keiner anderen Kultivierung reproduziert werden. Eine Fehlfunktion des Messgerätes kann nicht ausgeschlossen werden. Im zweiten Teilexperiment kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Lactatkonzentration. Die Ammoniumkonzentration verläuft unterhalb des angestrebten Wertes von 2 g/L. Ursache hierfür ist eine erneute Störung der reflektometrischen Messmethode durch Medienbestandteile, wie später anhand einer photometrischen Messung ermittelt wurde. Basierend auf diesen Messungen wurde der Ammoniumgehalt zu gering eingestellt. Der Phosphatgehalt steigt in beiden Teilexperimenten zu Beginn an. Da während der Kultivierung kein Phosphat zugeführt wird, nimmt die Konzentration während der Kultivierung durch den Aufbau von Biomasse ab. Die Cephalosporin-Konzentration steigt während beider Teilexperimente zumeist exponentiell. Im ersten Teil wird hierbei ein Wert von 8,4 g/L, im zweiten Teil ein Wert von 14,4 g/L erreicht. Verglichen mit den Maximalwerten aus der Kultivierung des unmodifizierten Stammes in Abbildung 5.10 auf Seite 96 von 7,6 g/L wird im ersten Teil der Repeated-Batch-Kultivierung ein vergleichbarer, im zweiten Teil fast der doppelte Wert erreicht. Die Produktbildungsrate aus der Kultivierung des unmodifizierten Stammes von 0,047 g/L·h wird im ersten Teil mit 0,060 g/L·h übertroffen. Mit 0,1814 g/L·h wird im zweiten Teil der Maximalwert von 0,271 g/L·h nicht erreicht. Durch das Repeated-Batch-Experiment wird die durchschnittliche Produktionsrate auf 0,121 g/L·h und die maximale Produktionsrate auf 0,686 g/L·h gesteigert. Die maximale Produktionsrate ist damit höher als der von Seidel [44] erreichte Wert. Die Pen N-Produktion ist im ersten Teil gering. Im zweiten Teil kommt es bei 200 h zur Produktion größerer Mengen Pen N. Ursache hierfür ist der Sauerstoffmangel, der aus dem Verlauf des Gelöstsauerstoffgehalts in Abbildung 5.10 auf Seite 96 hervorgeht.

5.4 Kultivierung des modifizierten Stammes von *Acremonium chrysogenum* im Umwurfreaktor

Bei mehreren Experimenten, die im Rahmen dieser Schrift nicht erörtert werden sollen, konnte der Sauerstoffbedarf mit dem Reaktorsystem Biostat C nicht sicher gestellt werden. Als Ursache wird neben der hohen Stoffwechselaktivität die hohe Viskosität der Kulturen angenommen. Diese führt sowohl zu einer mangelhaften Dispersion der Luftblasen, als auch zu einer unzureichenden Durchmischung des Reaktorinhalts insbesondere in axialer Richtung. Gemeinsam mit Frau Ulrike Schimroszyk wurde daher das in diesem Kapitel beschriebene Experiment geplant und im Rahmen ihrer Schwerpunktarbeit [43] durchgeführt.

Durch die aktive Umwälzung des Reaktorinhalts in einem Umwurfreaktor, in dem entgegen der Flussrichtung Druckluft zur Begasung eingebracht wird, soll eine bessere Vermischung erzielt werden. Daneben besteht bei dem als Umwurfssystem umgerüsteten Biostat UD-System die Möglichkeit durch Druckerhöhung und Sauerstoffzugabe zur Zuluft den Sauerstoffeintrag weiter zu erhöhen.

Betrachtet man den Verlauf des Gelöstsauerstoffgehalts in Abbildung 5.13, erkennt man,

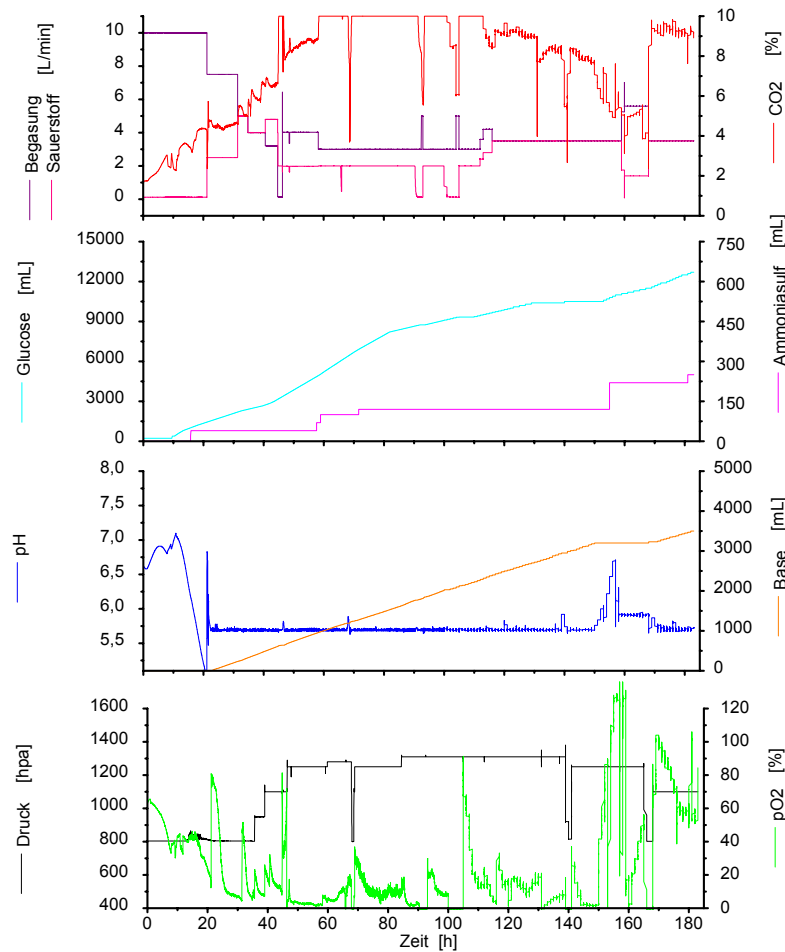


Abb. 5.13: Darstellung der Online-Daten aus der Kultivierung, die im Umwurfreaktor durchgeführt wird. Gegenüber den beiden vorangegangenen Experimenten beträgt das Kulturvolumen hier 28 L.

dass der Einsatz des Umwurfreaktors mit den vorhandenen Geräten keinen ausreichenden Sauerstoffeintrag generierte. Grund ist, dass die maximale Drehzahl von 800 rpm nicht ausreicht, um die Abwärtsströmung im Leitrohr soweit zu steigern, dass die Luft nicht mehr im Leitrohr an die Oberfläche steigt und nach unten heraus gedrückt wird. Auch die Begasung mit reinem Sauerstoff und eine Verringerung der Begasungsrate führen nicht zu einer ausreichenden Sauerstoffversorgung. Der Kohlendioxidgehalt der Abluft übersteigt zeitweise den

Messbereich (Obergrenze 10 %). Die Druckerhöhung erbrachte nicht den erwünschten Effekt. Die Gase Kohlendioxid und Sauerstoff wirken antagonistisch. Eine deutliche Erhöhung des Sauerstoffübergangs aus der Gasphase wird nur während einer kurzen Phase nach der Druckerhöhung beobachtet, wie in Abbildung 5.13 auf der vorigen Seite anhand des Verlaufes des Gelöstsauerstoffgehalts zwischen 30 h und 50 h bzw. zwischen 70 h und 140 h zu beobachten ist. Da sich die Zellen häufig im anaeroben Stoffwechselzustand befinden ist der Glucoseverbrauch (453,57 mL/L) und Baseverbrauch (124,64 mL/L) geringer als in den beiden zuvor präsentierten Kultivierungen. Die benötigte Glucosemenge ist daher anhand von Erfahrungswerten schwierig kalkulierbar. Basierend auf einer unzureichenden Glucoseversorgung steigen der Gelöstsauerstoffgehalt und der pH-Wert nach 70 h und 140 h kurzfristig an. Die generellen

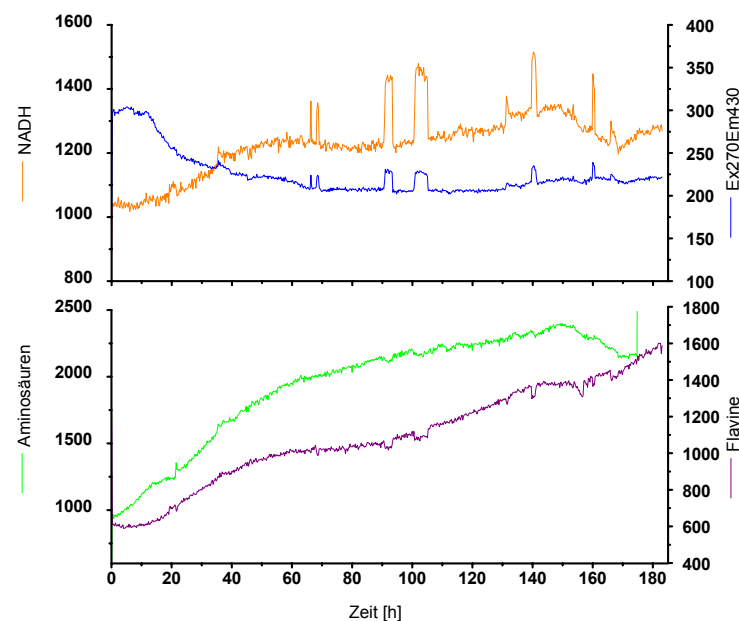


Abb. 5.14: Ausgewählte Messreihen der Fluoreszenz-Daten der Kultivierung im Umwurfreaktor

Verläufe der Fluoreszenzintensitäten dieser Kultivierung von Aminosäuren, Flavinen, NADH, und am Messpunkt Ex 270 nm/Em 430 nm, die in Abbildung 5.14 dargestellt sind, können im Vergleich mit den vorher gehenden Experimenten besser reproduziert werden. Der Anstieg der Aminosäurefluoreszenz ist stärker ausgeprägt als bei den voran gegangenen Experimenten, was auf eine erhöhte Biomasseproduktion hindeutet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensitäten von NADH und Flavinen ist schwächer als bei den anderen Kultivierungen. Dies ist ein Indiz für geringere Stoffwechselaktivität. In den Verläufen der Fluoreszenzintensitäten von NADH und des Messpunktes Ex 270 nm/Em 430 nm treten Unregelmäßigkeiten in Form von sprunghaften Intensitätsanstiegen auf. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Intensität der Flavinfluoreszenz und der Aminosäurefluoreszenz. Diese Schwankungen gehen auf die Variati-

on von Reaktorinnendruck und Sauerstoffgehalt in der Zuluft zurück. Nach 66,5 h, 91 h, 101 h und 158 h wird die Sauerstoffkonzentration der Zuluft jeweils kurz verringert und wieder erhöht. Dabei kommt es aufgrund der temporären Verringerung der Sauerstoffkonzentration im Medium zu einer vorübergehenden Abschwächung von Löscheffekten durch Sauerstoff. Nach 67,5 h, 139 h und 167 h wird dieser Effekt durch eine Druckverringerung, gefolgt von einer erneuten Druckerhöhung verursacht. Aus den Offline-Daten in Abbildung 5.15 geht hervor, dass

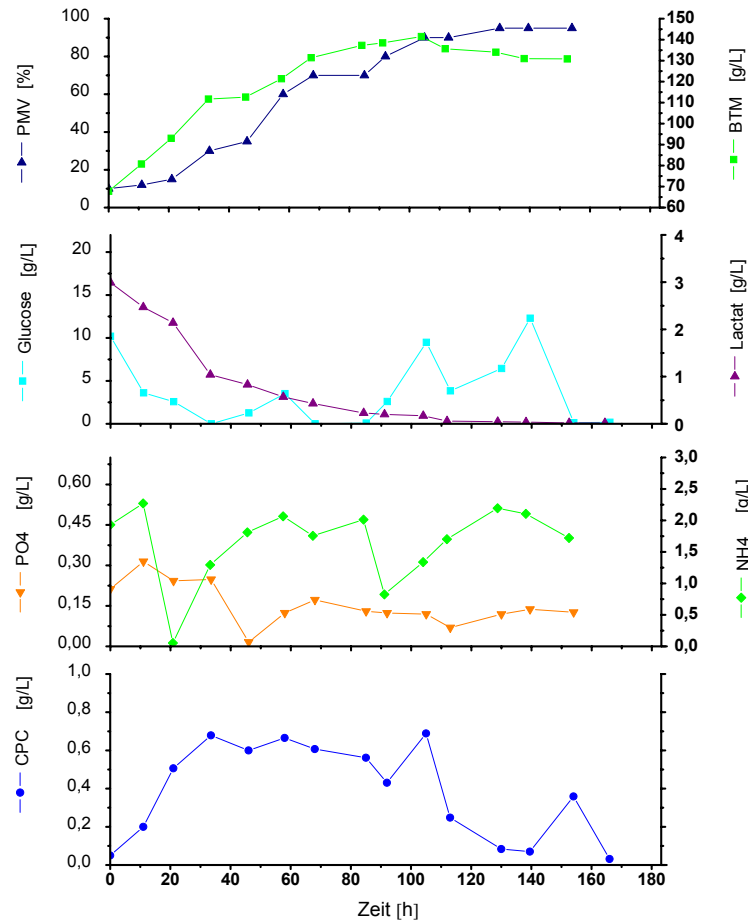


Abb. 5.15: Zusammenfassung der offline bestimmten Parameter aus der Kultivierung im Umwurfreaktor

die Biomasse und der PMV-Wert deutlich höher ansteigen als in den anderen Kultivierungen. Die Biotrockenmasse erreicht nach 105 h mit einem Wert von 140 g/L den Maximalwert und sinkt bis zum Ende der Kultivierung auf 130,8 g/L ab. Der PMV-Wert steigt bis zum Ende der Kultivierung auf 95 %. Die Glucosekonzentration schwankt zwischen 0 und 12 g/L. Der Glucosemangel nach 70 h und 140 h wird auch in den Fluoreszenzdaten in Abbildung 5.14 auf der vorigen Seite wieder gefunden. Die Lactatkonzentration geht innerhalb von 110 h asymptotisch gegen 0. Die Ammoniumkonzentration liegt, abgesehen von den Proben nach 21 h

und 92 h, immer zwischen 1,3 g/L und 2,3 g/L. Im Unterschied zu den anderen vorgestellten Kultivierungen wird das Phosphat nicht vollständig umgesetzt. Die CPC-Ausbeute ist mit einem Maximalwert von 0,688 g/L deutlich geringer als bei den anderen Experimenten. Pen N kann nicht ermittelt werden.

Da es sich bei Hämoglobinen um Proteinstrukturen handelt, ist eine Struktur- und Wirkungsgradabhängigkeit vom pH-Wert anzunehmen. Daher wird bei dieser Kultivierung der intrazelluläre pH-Wert der Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF bestimmt. Die Methode ist in Anhang A.1 beschrieben. Für die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts stehen nur

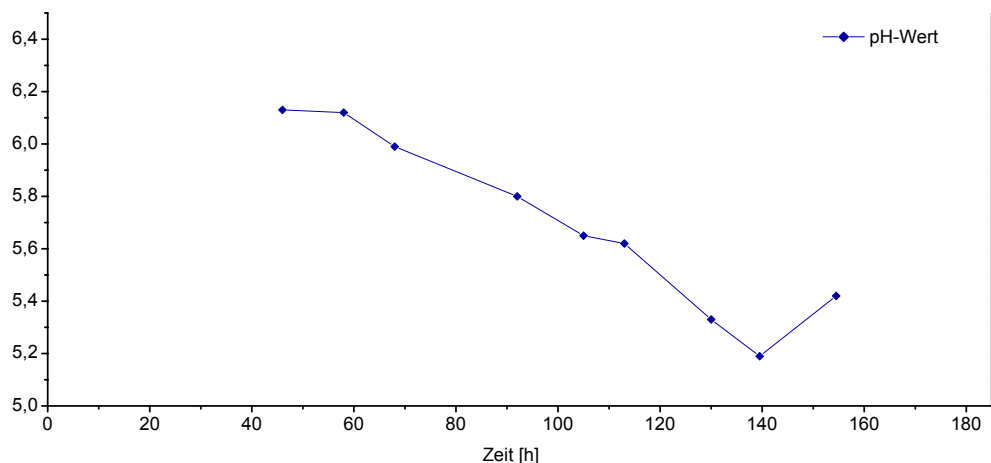


Abb. 5.16: Verlauf des intrazellulären pH-Werts der Kultivierung im Umwurfreaktor. Der pH-Wert wird mit BCECF bestimmt.

Proben zwischen 46 h und 154 h zur Verfügung. Zuvor ist die Zellmasse zu stark durch Medienkomponenten verunreinigt, um die Messung fehlerfrei durchzuführen. In der Probe nach 154 h kann die Zellmasse nicht vollständig von der Sojaöl-Emulsion getrennt werden, wodurch die Messung ebenfalls verfälscht wird. Aus den Daten in Abbildung 5.16 ist ersichtlich, dass der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung von 6,13 auf 5,19 absinkt. Dies sind für Cytoplasma niedrige Werte. Der zu erwartende Wert für den pH-Wert von Cytoplasma liegt im Bereich von 6,8-7,4. Ein pH-Wert zwischen 5 und 6 liegt bei einzelligen Organismen in Vakuolen und Lysozymen vor. Der absinkende pH-Wert während der Kultivierung kann das Resultat zunehmenden Vakuolenvolumens in den Zellen oder von der Akkumulation acider Metabolite in den Vakuolen sein. Um diese These zu untermauern werden die folgenden Mikroskopaufnahmen vorgestellt. In Abbildung 5.17 auf der folgenden Seite Teil B ist die BCECF-Fluoreszenz des Zellagglomerats präsentiert. Teil A zeigt die Zellen unter Durchlichtbedingungen. Da fluoreszierende Bereiche teilweise deutlich voneinander getrennt auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass das Fluorophor nicht an die Membran adsorbiert, sondern in die Zellen eingedrungen ist. Wie in Abbildung 5.18 auf der folgenden Seite Teil B dargestellt, ist in saurer Umgebung die Fluoreszenz, die auf die Vakuolen und das Cytoplasma zurückzuführen ist,

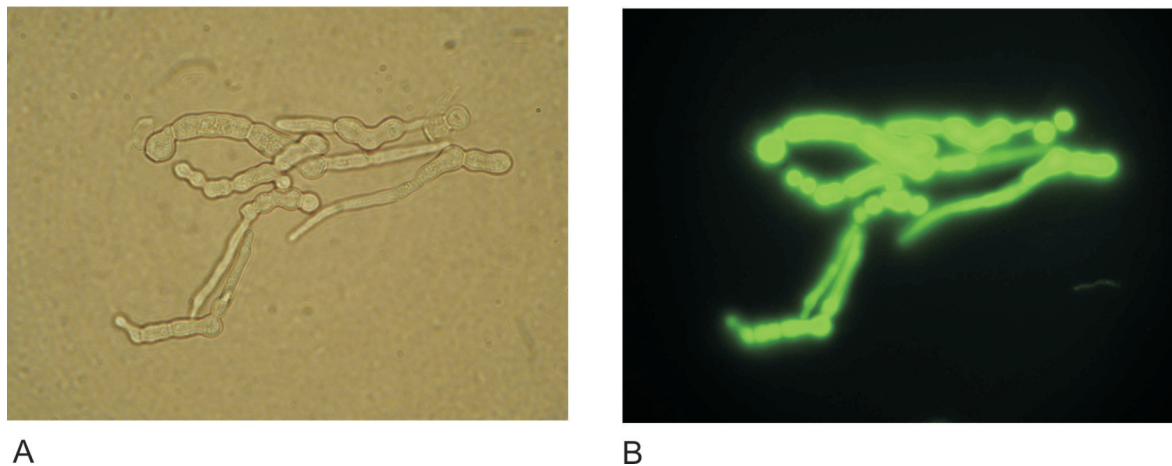


Abb. 5.17: Abbildungsteil A zeigt eine Aufnahme eines mit BCECF und Hygromycin präparierten Zellaglomerats in Puffer bei pH 8 und 400 facher Vergrößerung bei Durchlicht, Teil B zeigt das selbe Zellaglomerat bei UV-Licht.

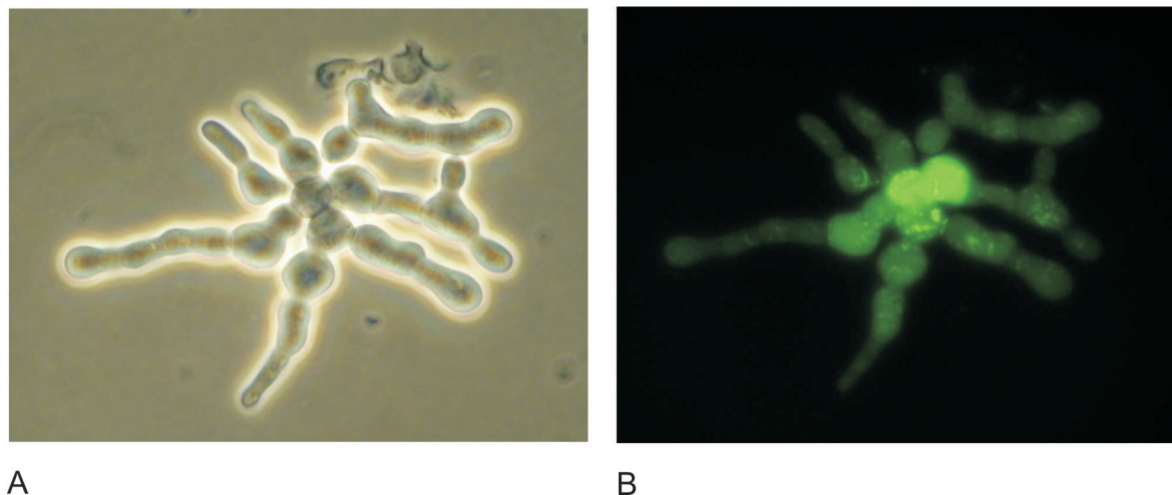


Abb. 5.18: Abbildung eines mit BCECF und Hygromycin präparierten Zellaglomerats in Puffer bei pH 5 und 400 facher Vergrößerung, im Teil A bei Durchlicht, im Teil B bei UV-Licht.

gering. Man erkennt, dass dennoch einige Bereiche in den Zellen stärker fluoreszieren als andere. Auch hier kann man sehen, dass die Zellen den Farbstoff aufgenommen haben. Ob die helleren Bereiche auf höhere Protonen- oder Farbstoffkonzentration zurückzuführen ist, kann nicht geklärt werden. Vermutlich handelt es sich um Zellorganellen. Abbildung 5.19 auf der folgenden Seite zeigt im Teil B und C die Zellen ohne Hygromycinzusatz bei UV-Licht. Die Zellen fluoreszieren nicht gleichmäßig. Besonders in Abbildung C sind Strukturen zu erkennen, die auf die Variation des intrazellulären pH-Werts zurückzuführen sind. Da sich die dunklen Bereiche aus kugelförmigen Körpern zusammensetzen, besteht die Möglichkeit, dass es sich hier um Vakuolen handelt.

Anhand der Abbildungen 5.17, 5.18 und 5.19 auf der folgenden Seite kann bestätigt werden,

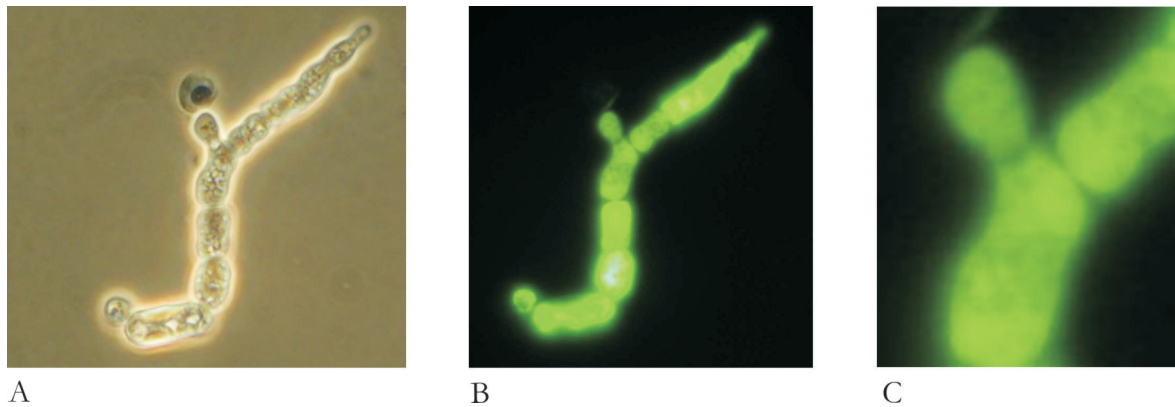


Abb. 5.19: Abbildung eines mit BCECF präparierten Zellagglomerats in EBSS-Puffer bei 400 facher Vergrößerung, im Teil A bei Durchlicht, im Teil B bei UV-Licht, Teil C zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Abbildungsteils C.

dass die Methode zur pH-Wertbestimmung mit BCECF von den Säugerzellen auf *Acremonium chrysogenum* übertragbar ist. Bestimmt werden kann mit BCECF aufgrund der Zellstrukturen jedoch nicht der pH-Wert des Cytoplasmas, da der pH-Wert in der Zelle nicht homogen ist. Vergleicht man die Fluoreszenzintensität zweier Zellproben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen werden, bei konstantem pH-Wert des Mediums, können Rückschlüsse auf die Entwicklung des Vakuolenvolumens der Zellen gezogen werden.

5.5 Beobachtung einer Kultivierung unter Verwendung eines Insitu-Mikroskops

Neben einer Vielzahl von Kulturparametern, die makroskopisch aus der Kulturbrühe oder der Abluft bestimmt werden können, ist auch die Morphologie der Zellen ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Kulturzustandes. Ist eine Probenahme nicht erwünscht oder nicht möglich, besteht mit Hilfe der Insitu-Mikroskopie die Möglichkeit, die Zellen direkt im Reaktor zu beobachten [8]. Bei der Verwendung von Kulturmedien mit hohem Feststoffanteil sind die Möglichkeiten der Insitu-Mikroskopie jedoch begrenzt. Um Schwebstoffe abzutrennen wird das CFC2-Medium vor der Kultivierung zentrifugiert. Die Kultivierung wurde in einem Biostat-B-Reaktor durchgeführt, in den ein 25 mm-Standardstutzen in die Reaktorwand eingebracht wurde, um das Mikroskop aufzunehmen. Das System, das am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover zur Verfügung steht, wurde im Rahmen verschiedener Projekte entwickelt. Eine Schemazeichnung des Mikroskops ist im Anhang A.1 dargestellt. Bei den praktischen Arbeiten unterstützte Herr Guido Rudolph. In Abbildung 5.20 auf der folgenden Seite sind Fotos dargestellt, die mit dem Insitu-Mikroskop bei 200 facher Vergrößerung erstellt wurden. Es sind sowohl Pellets als auch einzelne Zellen zu erkennen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Standardmethoden der Mikroskopie, bei denen die Zellen zwischen Ob-

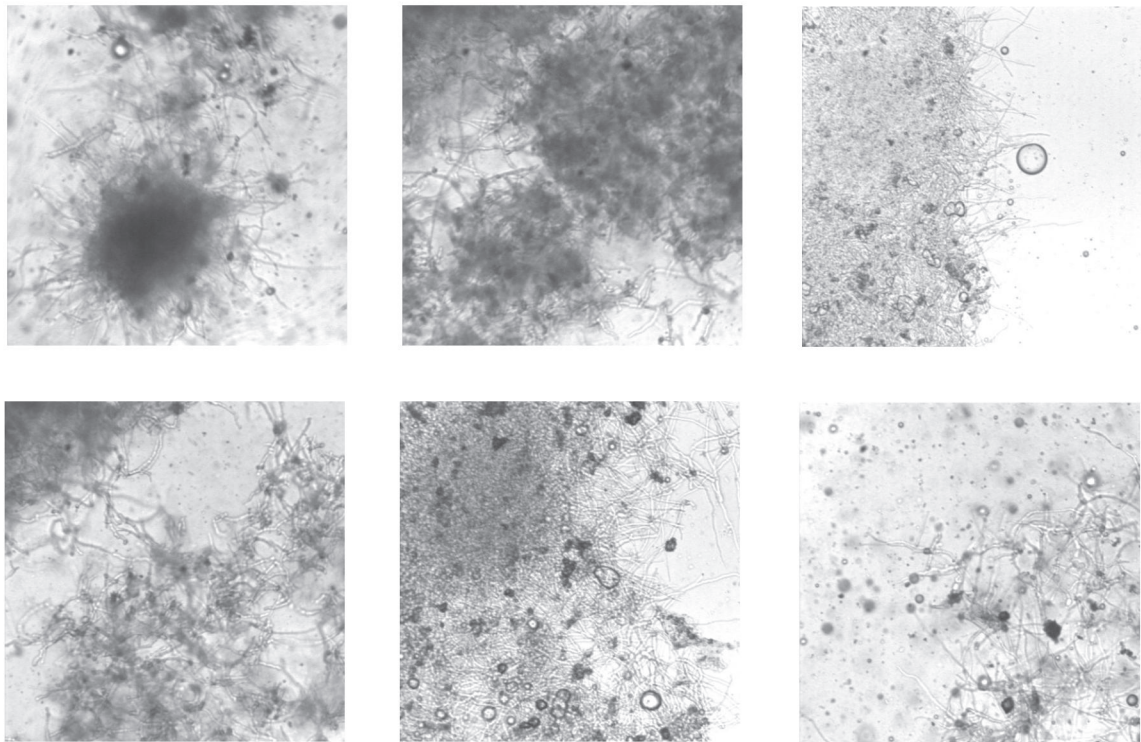


Abb. 5.20: Abbildung von Aufnahmen, die mit Hilfe der Insitu-Mikroskopie bei etwa 200-facher Vergrößerung erstellt wurden.

jektträger und Deckglas fixiert werden erhält man bei der Verwendung des Insitu-Mikroskops auch Erkenntnisse über die Bewegung der Zellen und Zellagglomerate im Medium sowie deren Plastizität. Letzteres ist insbesondere bei Video-Aufnahmen zu erkennen. Die Festigkeit der Zellagglomerate erscheint in Videosequenzen wie die Konsistenz eines sehr weichen, großporigen Schwammes. Sie sind sehr biegsam und können in den Turbulenzen des Mediums um die schwächste Achse wie um ein Scharnier schwingen. Möglicherweise leitet dieses Schwingen das Zerbrechen der Agglomerate in kleinere Kompartimente ein. Durch die Schwingung wird die Konvektion zwischen den Mycelarmen innerhalb des Zellagglomerats begünstigt. Somit ist die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung in diesem Bereich besser, als aus den Beobachtungen mit einem normalen Durchlichtmikroskop zu erwarten war. Eine weitere mögliche Anwendung der Insitu-Mikroskopie ist die Detektion von Fremdorganismen. Hefen können aufgrund ihrer Größe leicht identifiziert werden, wie Brückerhof beschreibt [8]. Bakterien sind aufgrund ihrer Bewegung eindeutig von Medienkomponenten zu unterscheiden.

5.6 Zusammenfassung und Ausblick der Kultivierungen von *Acremonium chrysogenum*

Die Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* ist sehr aufwändig. Eine präzise Reproduktion der Kultivierung erfordert vom Experimentator viel Geduld und Routine. Dies gilt nicht nur für die Handhabung der Bioreaktoren, sondern auch für den Umgang mit den Proben. Bei einigen Kultivierungen wurde eine Bestimmung der Viskosität mit Hilfe eines Fallkugelviskosimeters vorgenommen. Es wurden mehrfach Werte von über 100 Pa·s ermittelt. Dabei wurde eine Biotrockenmasse von etwa 220 g/L erreicht; Größenordnungen, die eine Handhabung der Proben mit handelsüblicher Laborausrüstung (Zentrifugen- und Mikroreaktionsgefäße, Pipetten, usw.) fast unmöglich machen. Das Sojaöl, das im Medium enthalten ist, führt zu einer Benetzung der Oberflächen von Pipettenspitzen und löst die Zentrifugenröhrchen bei der Trocknung für die Bestimmung der Biotrockenmasse auf. Es wurden zahlreiche Kultivierungen durchgeführt um einen validen Ablauf der notwendigen Prozeduren zu etablieren. Den Rahmen dieser Schrift würden die Arbeiten hierfür deutlich überschreiten. Daher sind nur ausgewählte Kultivierungen dargestellt. Anhand dieser Kultivierungen konnte gezeigt werden, dass die Modifikation des Organismus keinen Einfluss auf die Kultivierbarkeit im Bioreaktor nimmt. Es konnte aber auch demonstriert werden, dass die Zunahme der Produktivität durch die Expression des Genkonstrukts wenn überhaupt nur geringfügig verbessert wird. Die Expression konnte mit Hilfe der PCR-Methode nachgewiesen werden. Die jeweils maximalen CPC-Kon-

Experimentbezeichnung	Verwendeter Reaktor	Cephalosporinausbeute
s	Biostat UD	0,82 g/L
s Umwurf	Biostat UD, Umwurfbetrieb	0,669 g/L
l	Biostat UD	1,73 g/L
d	Biostat C	7,01 g/L
c	Biostat C	0,38 g/L
m	Biostat C	1,06 g/L
q	Biostat C	14,44 g/L
unmod 1	Biostat C	6,14 g/L
unmod 6	Biostat C	19,05 g/L

Tab. 5.2: Übersicht über die Cephalosporinausbeuten, die in verschiedenen Experimenten erzielt wurden. Die Experimente mit den Bezeichnungen q, s Umwurf und unmod 1 sind im Rahmen dieser Arbeit näher diskutiert worden.

zentrationen aus 9 Experimenten sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt. In einer Kultivierung wurde mit dem unmodifizierten Stamm eine höhere CPC-Konzentration erreicht, als in den Experimenten mit den modifizierten Organismen. Allerdings wurde bei dem Experiment mit der höchsten Ausbeute von der üblichen Kultivierungsprozedur abgewichen, das Resultat wurde in einem Repeated-Batch-Experiment erzielt.

Fraglich bleibt, ob die Verwendung von Hämoglobin als Sauerstoffüberträger bei *Acremonium chrysogenum* zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität führen kann. Diese These widerspricht den Ergebnissen von DeMondena *et.al.* [14]. Es ist jedoch zu bedenken, dass es sich bei den im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Organismen um Mutanten eines industriellen Hochleistungsstammes handelt, was bei DeMondena *et.al* aufgrund der erreichten CPC-Konzentration von etwa 5 g/L vermutlich nicht der Fall war. Ein Problem für das Wirken des Hämoglobins resultiert aus der Zellstruktur der Hochleistungsstämme. Die Zellen bestehen zu einem hohen Anteil aus Vakuolen. Diese stellen eine Barriere für die Diffusion des sauerstoffbeladenen Hämoglobins von der Zelloberfläche in das Zentrum der Zelle dar. Die Effektivität des Sauerstofftransfers in den Zellen kann durch VHb daher nicht signifikant gesteigert werden. Die Sauerstoffabgabe des Hämoglobins erfolgt nicht selektiv. Das Hämoglobin wird innerhalb der Zelle nicht aktiv transportiert. In Bereichen der Zelle mit geringem Gelöstsauerstoffgehalt ist die Sauerstoffabgabe zwar begünstigt, jedoch können dies auch Orte innerhalb der Zelle sein, die nicht an der CPC-Produktion beteiligt sind. Ein Beispiel hierfür sind die Mitochondrien, an deren Membranen durch die oxidative Phosphorylierung erhebliche Mengen Sauerstoff umgesetzt werden. Für einen Einfluss auf diese Bereiche der Zelle spricht die Erhöhung des Glucoseumsatzes und des Baseverbrauchs während der Kultivierung des modifizierten Stammes im Biostat C Reaktor gegenüber der Kultivierung des unmodifizierten Stammes. Darüber hinaus kann das *Vitreoscilla*-Hämoglobin auch als Oxidase wirken [15], was unerwünschte Nebenreaktionen hervorrufen kann. Indizien für solche Nebenreaktionen konnten jedoch nicht gefunden werden.

Eine Schwierigkeit, die aus dem verwendeten Originalstamm resultiert, ist das Anlegen von Stammkulturen. Die Herstellung von Arbeits- und Sicherungs-Zellbank, wie sie beispielsweise bei der Kultivierung von Säugerzellen allgemein anerkannter Stand der Technik ist, kann mit den vorhandenen Zellen nicht durchgeführt werden, da die Zellen beim Einfrieren ihre Produktivität verlieren. Die Lagerung von Sporen bildet keine Alternative.

Wird eine der Vorkulturen zu lange inkubiert, kommt es in der folgenden Kultur zu einer Lag-Phase, die sich über viele Stunden hinziehen kann. Während der Hauptkultur kommt es bei einigen Kultivierungen zur Bildung von sehr viel Biomasse. Dies führt zu einem hohem Sauerstoffbedarf einerseits und zu einer hohen Viskosität andererseits. Der Sauerstoffeintrag wird erschwert, da der Energieaufwand zur Gasdispersion ansteigt. Trotz Aufrüstung der vorhandenen Reaktoren konnte eine ausreichende Sauerstoffversorgung nicht immer sichergestellt werden. Insbesondere die Umrüstung zum Umrührreaktor hat sich nicht bewährt. Eine Optimierung der Rührorgane in Bezug auf ihre Form und Größe und eine Modifikation des Antriebs, besonders beim Biostat UD könnten zu einer Effizienzsteigerung des Sauerstoffeintrags führen. In allen Produktionskulturen, in denen ein maximaler Sauerstoff für die CPC-Produktion zwingend notwendig ist, haben sich die Zellen als unempfindlich gegen den ausgeübten

Scherstress erwiesen.

Die Anwendung der Insitu-Mikroskopie ist in der Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* unter wirtschaftlichen Aspekten nicht effizient, da der hohe Feststoffanteil in vielen industriell eingesetzten Medien die Messung behindert. Unter akademischen Gesichtspunkten und in speziell präparierten Medien kann mit Hilfe der Insitu-Mikroskopie die dreidimensionale Bewegung der Zellagglomerate beobachtet werden. Dies kann zusammen mit Strömungssimulationen zu neuen Erkenntnissen über die Substratversorgung der Zellen innerhalb des Agglomerats führen kann.

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie konnte hingegen in allen Reaktorstufen erfolgreich eingesetzt werden. Substratmangel, Stoffwechselumstellung und Proteinbildung konnten trotz der hohen Eigenfluoreszenz des Mediums detektiert werden. Der starke Einfluss des Sauerstoffs als Quencher konnte anhand der Kultivierung im Umwurfreaktor gezeigt werden. Eine Prognose zur Regelung des Prozesses basierend auf den Fluoreszenzdaten ist schwierig, da die Eigenfluoreszenz des Mediums mit jeder Charge variiert.

Mit Hilfe von BCECF kann eine pH-Wert-Messung in den Zellen erfolgen. Bei der Messung mit dieser Methode kann jedoch nicht der pH-Wert des Cytoplasmas ermittelt werden, sondern nur der pH-Wert des Vakuoleninhalts. Setzt man voraus, dass dieser während der Kultivierung konstant bleibt, erhält man aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten Anhaltspunkte für die Entwicklung des Vakuolenanteils der Zellen. Dies ist interessant für die CPC-Produktion, da essenzielle Enzymsysteme hierfür auf den Vakuolenmembranen lokalisiert sind.

A Anhang

A.1 Methoden

A.1.1 Potentiometrische pH-Wert-Messung (Online)

Zur Messung des pH-Wertes wird eine sterilisierbare Einstabmeßkette (Polyclave 220 mm, Fa. Hamilton) verwendet, die mit der Steuereinheit des Fermenters verbunden ist. In der Einstabmesskette befinden sich eine Glas- und eine Vergleichselektrode. Die eigentliche Messgröße ist die Spannung zwischen den Elektroden, die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Der Zusammenhang zwischen der Spannung und dem pH-Wert ist über die Nernst'sche Gleichung gegeben. Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgt vor dem Autoklavieren der Bioreaktoren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,01 und pH 7,0, Fa. Mettler Toledo). Zur Aufbewahrung wird die Elektrode in 3M Kaliumchloridlösung (Fa. Fluka) gelagert.

A.1.2 Amperometrische Gelöstsauerstoffmessung (Online)

Der Gelöstsauerstoff wird mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Inpro 6800, Fa. Mettler-Toledo) als Sauerstoffpartialdruck amperometrisch gemessen. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, die die Messlösung von der Ag-Anode und Pt-Kathode trennt, und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert. Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren im Fermenter-System kalibriert (Zwei-Punkt-Kalibration). Vor der Kalibration muss die Elektrode 6 h polarisieren. Zur Kalibration wird zunächst durch Begasung mit Stickstoff (Fa. Linde) der 0 %-Wert eingestellt. Der 100 %-Wert wird durch Begasung mit Druckluft unter Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl und Begasungsrate) eingestellt. Die während der Fermentation gemessenen Werte geben die relative Sauerstoffsättigung an.

A.1.3 Analytik der Abluftparameter Sauerstoff und Kohlendioxid

Die Abgasanalyse wird mit einem Eigenbausystem, bestehend aus einer Messgasaufbereitung sowie den Komponenten URAS 14 und Magnos der Fa. ABB durchgeführt. Das Gesamtsystem zur Messgasaufbereitung besteht aus dem Messgaskühler mit Kondensatauffanggefäß zum Trocknen des Messgases, der Messgasfördereinheit mit Überwachung von Fluss und Feuchtigkeit und den Analysegeräten zur Messung von Kohlendioxid und Sauerstoff.

Der Sauerstoffgehalt wird mit Hilfe des Prinzips der paramagnetischen Waage bestimmt. Das Analysegas durchströmt dabei eine Messkammer, die von einem Magnetfeld durchdrungen ist. Das Magnetfeld wirkt auf einen beweglichen Metallklöppel, dessen Auslenkung ein Messsignal erzeugt. Die Kraft, die das magnetische Feld auf den Klöppel ausübt, ist abhängig von der magnetischen Suszeptibilität des den Zwischenraum ausfüllenden Mediums. Bei den Komponenten Stickstoff und Kohlendioxid handelt es sich um Diamagnetika, Sauerstoff hingegen

ist aufgrund der ungepaarten Elektronen im Triplett-Zustand paramagnetisch. Dies führt zu einer Auslenkung des Klöppels, die einzig vom Sauerstoffgehalt der Abluft abhängt.

Der Kohlendioxidgehalt wird optisch bestimmt. Ein auf Kohlendioxid sensibilisiertes, einstrahlendes IR-Photometer nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Die Bestimmung erfolgt nichtdispersiv bei spezifischen Wellenlängen (NDIR-Bestimmung). Strahlungsquelle ist ein unterkühlter Glühfaden (700 °C). Die vom Strahler ausgehende IR-Strahlung wird durch eine von einem Synchronmotor angetriebenen Blende in intensitätsgleiche Anteile zerlegt, die abwechselnd die Analysenhälfte und die Vergleichshälfte (gefüllt mit kohlendioxidfreiem Gas) der zweigeteilten Küvetten durchstrahlen. Beide Strahlungsanteile treten in eine Doppelschicht-Absorptionskammer ein, die mit Kohlendioxid gefüllt ist. Die beiden Schichten stehen mit einem Membrankondensator in Verbindung. Kohlendioxid in der Analysenhälfte absorbiert die spezifische Strahlung, was zu einer proportionalen Auswölbung der Membran und damit eine entsprechende Kapazitätsänderung des Membrankondensators verursacht.

A.1.4 Insitu-Mikroskopie

Bei der Insitu-Mikroskopie handelt es sich um eine Methode der Online-Analytik. Gegenüber anderen mikroskopischen Methoden besteht hier die Möglichkeit, in Echtzeit die Morphologie der Zellen zu beurteilen. Auch die Probenahme, die ein Infektionsrisiko darstellt, entfällt. In

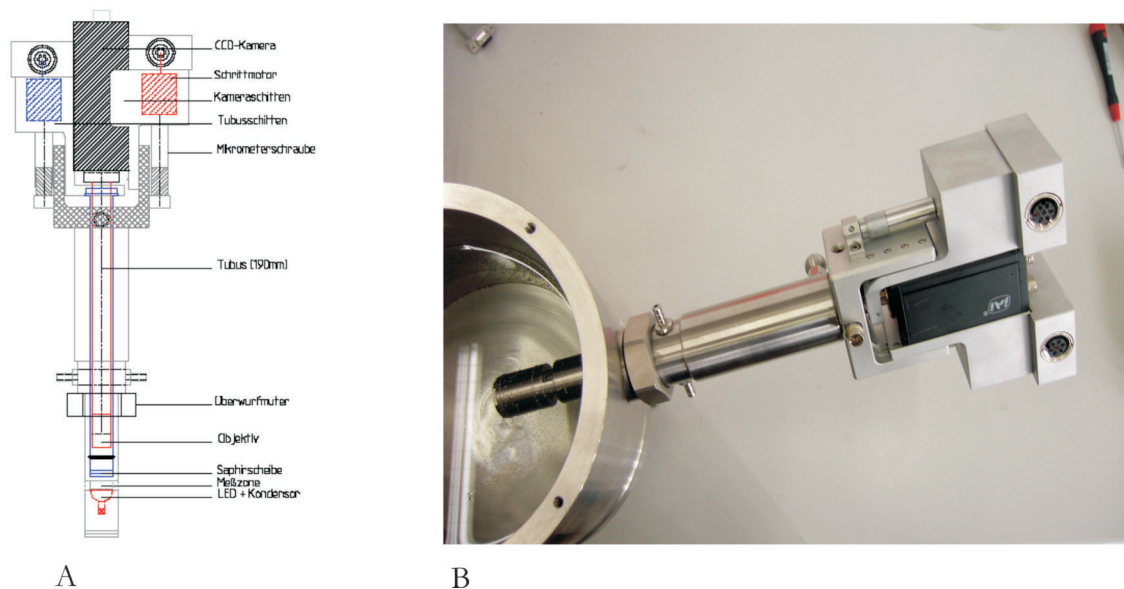


Abb. A.1: Darstellung des Insitu-Mikroskops in Teil A als Schemazeichnung, in Teil B als Abbildung, eingebaut in einen Bioreaktor

Abbildung A.1 ist im Teil A eine Schemazeichnung des Insitu-Mikroskops dargestellt. Über einen 25 mm-Standardport wird das Mikroskop, wie in Teil B der Abbildung A.1 dargestellt,

in den Bioreaktor eingelassen. In Medienkontakt treten dabei nur die Saphirglasscheiben, die den Bereich der LED bzw. des Objektivs gegen das Medium abdichten, sowie der Metallkorpus. Der Bereich der Messzone kann bei Verunreinigung oder Verblockung in den Tubus gezogen werden und hier, beispielsweise mit Dampf, gereinigt werden. Die Einstellung der Messzone und die Fokussierung wird mit Hilfe von Stellmotoren über einen PC eingestellt. Für die Aufnahmen wird die Tiefe der Messzone auf ca. 0,2 mm eingestellt. Dieser Wert ist ausreichend, um auch Zellagglomerate passieren zu lassen, und lässt noch hinreichend Licht für eine Aufnahme durch die Flüssigkeitsschicht dringen. Die Schemazeichnung der Messzone

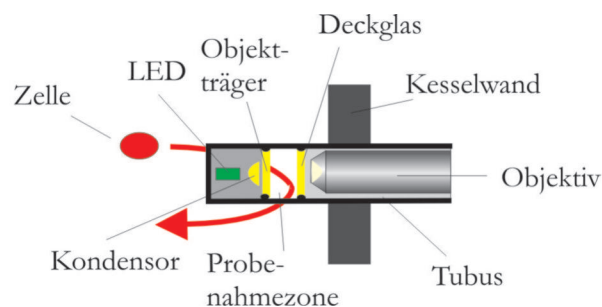


Abb. A.2: Schematische Abbildung der Messzone bei der Passage einer Zelle

zeigt Abbildung A.2. Zwischen den Aufnahmen ist eine vollständige Öffnung der Messzone notwendig, um ein Verblocken zu verhindern. Die Aufnahme der Bild- bzw. Videosequenzen erfolgt mit einer CCD-Kamera. Eine weitere Aufarbeitung der Bilder ist bisher nur bei einzelligen Organismen möglich (Zellzahlbestimmung [8], Größenbestimmung, etc). Anhand der Videosequenzen ist eine Beurteilung von der Beweglichkeit [37] der Organismen möglich.

A.1.5 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Für die 2D-Fluoreszenzmessungen werden zwei verschiedene Fluoreszenzspektrometer verwendet: Der BioView-Sensor (Fa. Delta Danish Electronics, Light & Acoustics) wird für die Online-Messung bei den Kultivierungen in Bioreaktoren eingesetzt. Die Messungen des intrazellulären pH-Wertes werden mit dem Fluoreszenzspektrometer Hitachi F-4500 durchgeführt.

Beim BioView-Sensor handelt es sich um ein Gerät, das speziell für den Einsatz in Industrie- und Technikumsanlagen entwickelt wurde. Es ist in einer Edelstahlbox untergebracht und so gegen Umwelteinflüsse wie Nässe, Temperaturschwankungen und mechanische Belastungen geschützt. Die Steuerung der Fluoreszenzmessung und die Datenaufnahme erfolgen mit einem PC. Als Lichtquelle dient eine Xenonlampe. Die Monochromatisierung des Exzitations- und Emissionslichts erfolgt mit Hilfe von Schmalband-Interferenzfiltern. Die Filter mit jeweils 20 nm Bandbreite sind auf Filterrädern montiert und können so nacheinander in den Strahlengang geführt werden. Sie decken einen Exzitationsbereich von 260 nm bis 560 nm und einen Emissionsbereich von 300 nm bis 600 nm ab. Erstmals wurde dieses System von Seidel [44]

an einer Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* erprobt.

Beim Hitachi F-4500 handelt es sich um ein PC-gesteuertes Spektralphotometer, dass für die Messung von Lösungen in Küvetten geeignet ist. Als disperse Elemente dienen bei Exzitation und Emission Konkavgitter mit 900 Linien je mm und verstellbarer Spaltbreite. Als Lichtquelle dient eine Xenonlampe. Die Detektion des emittierten Spektrums erfolgt mit einem Photomultiplier, dessen Messwerte einer EDV zugeführt werden. Die Schrittweite des Exzitations- und Emissionsbereichs kann unabhängig voneinander zwischen 200 nm und 900 nm eingestellt werden. Für die Messungen werden Küvetten aus Quarz (Suprasil, Fa. Helma) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Für die Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers werden eine Scangeschwindigkeit von 12000 nm/min, eine Spaltbreite von 10 nm, eine Schrittweite von 5 nm gewählt

A.1.6 Biomassebestimmung und Vorbereitung des Kulturüberstandes für die weitere Analytik

Zur Biomassenbestimmung werden 10 mL der Probe in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) abgefüllt. Um Gewichtskonstanz zu erreichen, wird das Eppendorfggefäß vorher bei 110 °C im Ofen ausgeheizt und daraufhin bei Raumtemperatur im Exsikkator ausgekühlt, bevor sein Gewicht bestimmt wird. Die Probe wird bei 4000 rpm 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0 RS, Heraeus Instruments, Kendro, Hanau, Deutschland). Am Zentrifugenröhrchen kann der PMV-Wert direkt abgelesen werden. Vom erhaltenen Überstand werden 2 mL für die weiteren Analysen präpariert. Dieser wird in Zentrifugenröhrchen der Fa. Eppendorf überführt und erneut zentrifugiert (13200 rpm, 15 min, Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg). Das Sediment wird über 5 Tage im Trockenofen bei 110 °C getrocknet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Medienbestandteile erhält man so nicht die reine Biotrockenmasse. Ein großer Teil der Trockenmasse besteht aus Feststoffanteilen aus dem Medium. Die gemessene Trockenmasse gibt so nur indirekt einen Eindruck vom Zuwachs der Biomasse. Allerdings wird im Laufe der Kultivierung der Feststoffanteil des Mediums immer geringer. Die so gemessene Biomasse gibt dennoch einen Anhalt auf den Kultivierungsverlauf.

A.1.7 High Performance Liquid Chromatographie

Die Proben werden nach der Entnahme durch Fällung mit Methanol (1:5, v/v) entproteiniert und dann bei -18 °C gelagert, um die Hydrolyse und enzymatische Reaktionen zu stoppen. Damit die Proben gemessen werden können, werden sie 20 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 RS, Heraeus Instruments, Kendro, Hanau, Deutschland). Außerdem müssen die Proben vor der Messung mit einem Spritzenfilter (Millex-Gp, 0,22 µm, Millipore, Eschborn) filtriert werden.

Zur Kalibration der Methode dienten Cephalosporin C Zinksalz (Analysennummer: 334304/1

694) und Penicillin G (Lot & Filling Code: 366877/1 5460) von Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz. Cephalosporin C wird in den Konzentrationen 15, 10, 5 und 1 mM, Penicillin G in den Konzentrationen 100, 50, 25 und 10 mM eingesetzt. Weitere Substanzen stehen zur Kalibration nicht zur Verfügung. Penicillin N hat sich in Lösung als zu instabil erwiesen um mit der vorhandenen Apparatur valide vermessen zu werden.

Als Trennsäule dient eine mit Nucleosil 100 (Macherey-Nagel, Düren) gepackte Chromatographiesäule mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4,6 mm. Die stationäre Phase besteht aus einem modifizierten, sphärischen Silicagel mit Octadecylsilanketten (C18). Vor die Trennsäule wird eine mit Vydac C18-Material (Macherey-Nagel, Düren) gefüllte Vorsäule geschaltet. Sie dient zum Schutz des eigentlichen Trennmateri- als und soll Proteine und andere Verunreinigungen aus dem Medium zurückhalten. Es wurde nach der Methode der Reversed-Phase-Chromatographie gearbeitet, bei der in Umkehrung zur Normalphasenchromatographie die mobile Phase polarer als die stationäre Phase ist. Als Eluentenzusammensetzung wurde eine 14 mM Phosphatpufferlösung (pH 6,5), die 10,3 mM/L Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) und 5 % Methanol enthält, verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 mL/min, das Injektionsvolumen war 5 mL und die Messdauer 45 Minuten.

Die computergesteuerte Anlage ist mit einem Autosampler (Promis II, Spark, Emmen, Niederlande), einem Entgaser (TS 7505, Techlab, Erkerode), einer Pumpe (LCP 4100, Techlab, Erkerode) und einem UV-Detektor (UVIS 201, Linear Instruments, Fremont, California) ausgestattet. Die bei 30 °C im Säulenofen (Modell 125, ERC, Rheinbach) temperierten Standards und Proben wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen [2].

A.1.8 Ammonium

Zur Ammoniumbestimmung dient ein Test-Set der Firma Merck KgaA, Darmstadt (Spectroquant 14752). Charakteristisch für diese Methode ist ein stark alkalisches Reaktionsmedium, das durch Zugabe eines alkalischen Tartrateagenzes einen pH-Wert von ca. 13 erreicht. Nach Zugabe des zweiten Reagenzes, einem trockenen Chlorierungsmittel, reagiert das bei diesem pH-Wert als Ammoniak vorliegende Ammonium innerhalb von 5 Minuten quantitativ zu Monochloramin. Dieses wird mit Natriumnitroprussid und Thymol zu N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinonmonoimin umgesetzt. Das Chinon-Monoimin reagiert dann mit einem weiteren Thymolmolekül zu Indophenol, das im alkalischen Medium in der blauen Basenform vorliegt. Die Extinktion wurde bei 690 nm im Platerader-Modul des Photometers MultiSkan der Fa. Thermo in 24-Lochplatten der Fa. Nunc gemessen. Zur Kalibration des Testes diente eine 100 ppm-Ammoniumchlorid-Lösung, aus der eine Verdünnungsreihe hergestellt wurde [2].

A.1.9 Glucose

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgt mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select der Firma Yellow Springs Instruments, Ohio, USA. Der Analyt wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Dieses wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelluloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert. Die Kalibration des Analysators erfolgte mit Hilfe einer Standardlösung der Glucosekonzentration 4 g/l.

A.1.10 Optische Dichte

Die optische Dichte (OD_{580}) der Kulturlösung, wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 580 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Kulturprobe wird vor der Messung auf das 100-fache Volumen mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. In einer 1,5 ml Einwegküvette (Halbmikroküvetten, Nr. 1202, Fa. Ratiolab) mit 1 cm Schichtdicke wird dann bei 25 °C gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung (aq.) die Extinktion gemessen. Die NaCl-Lösung kann hier als Referenz verwendet werden (Nullabgleich), da entsprechend verdünntes, zellfreies Kulturmedium bei der eingestellten Wellenlänge eine zu vernachlässigende Absorption besitzt. Es werden jeweils drei Parallelbestimmungen durchgeführt, um Verdünnungsfehler zu minimieren.

A.1.11 Intrazellulärer pH-Wert

Für die Messung werden die Zellen durch Zentrifugieren (15 min bei 1000 rpm, 4 °C Megafuge 1.0 RS, Heraeus Instruments, Kendro; 50 mL-Zentrifugenröhrchen, Fa. Sarstedt) aus der Kulturbrühe abgetrennt. Ca. 5 mL des Sediments werden entnommen und in 10 mL in EBSS-Puffer resuspendiert. Erscheint das Sediment nach Abzentrifugieren homogen, werden die Zellen für die Messung verwendet. Ist das Sediment inhomogen, wird der Waschvorgang wiederholt. Für die Messung werden ca. 100 mg Sediment in 10 mL EBSS-Puffer resuspendiert und mit 10 μL BCECF-Arbeitslösung versetzt. Die Zellsuspension wird für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, danach wie oben zentrifugiert, gewaschen und resuspendiert. Diese Suspension wird in Portionen von 1 mL in Mikroreaktionsgefäße (Fa. Sarstedt) umgefüllt und 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Cetrifuge 5437, Fa Eppendorf). Zwei der Proben werden in EBSS-Puffer resuspendiert. Die verbliebenen Proben werden für die Erstellung der Kalibrationsreihe in Puffern der pH-Werte 5 - 8,5 (in Schritten von 0,5 Einheiten) resuspendiert. Alle Proben werden 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend in einer Halbmikroküvette (Suprasil, Fa. Helma) mit dem Fluoreszenzspektrophotometer Hitachi 4500 F vermessen. Die Methode wird unter Berücksichtigung von Burzlaff [11] entwickelt.

A.1.12 Sterilisation

Alle Glas- und Kunststoffgefäße werden in einem Autoklaven V 150 (Systec) sterilisiert. Dafür werden die Gefäße für 20 min auf 121 °C erhitzt. Danach wird die Temperatur durch Wasserkühlung auf 80 °C abgesenkt und die Gefäße werden zum weiteren Abkühlen entnommen. Medien mit Agar werden auf 50 °C abgekühlt, bevor sie vergossen werden. Der Biostat B Reaktor (Sartorius) wird mit Medium gefüllt und dann im Autoklaven V 150 (Systec) für 1 h auf 121 °C erhitzt. Die Reaktoren Biostat C und Biostat UD (Sartorius) werden in place sterilisiert. Dafür werden sie mit dem system eigenen Thermostaten für 30 min auf 121 °C erhitzt. Die verwendeten Gase werden durch Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm geleitet. Es werden Produkte der Firmen Pall und Sartorius verwendet.

Flaschen	Spritzenvorfilter	Sartorius
Biostat B	6300 - Serie	Sartorius
Biostat C	Kartusche Mini	Sartorius
Biostat UD	Fibox 3	Pall

A.1.13 PCR

A.1.13.1 RNA Isolierung mit heißer Phenollösung

1. Lösen des Zellpellets in 900 µL Lysozym (1mg/mL gelöst in TE-Puffer pH 8). Zugabe von 90 µL 10 % SDS. Anschließend für 1-2 min auf 64 °C erhitzen.
2. Zugabe von 100 µL Natriumacetatlösung (1M, pH 5,2)
3. Zugabe von 1 mL mit Wasser gesättigtem Phenol (pH unter 7). 10 x invertieren und bei 64 °C 6 min inkubieren. Dabei 6-10 x invertieren.
4. Lösung für 2 min auf Eis stellen, dann bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugieren
5. Überführen der wässrigen Phase in ein Mikroreaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) (2 mL Nennvolumen), Zugabe des äquivalenten Volumens Chloroform. 10 x invertieren, bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugieren.
6. Wässrige (obere) Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, 2 mL Nennvolumen) überführen. 1/10 des Volumens an NaCl-Lösung (5 M) und das doppelte Volumen an kaltem Ethanol (-20 °C) zufügen. Für 20 min bei -80 °C inkubieren.
7. Bei 13000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugieren.

8. Waschen des Pellets durch Übersichten mit 70-80 % Ethanol dann bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugieren.
9. Überstand verwerfen. Pellet trocknen. Lösen der RNA in 50-500 μ L RNase-freiem Wasser.
10. Messen von Konzentration und Reinheit am Photometer.

A.1.13.2 DNase I Verdau

Vorschrift für 100 μ L RNA-Lösung

1. 25 μ L 25mM MgCl_2 zufügen.
2. 12,5 μ L 200mM Tris-HCl (pH 8) zufügen.
3. 2 μ L (20 U) DNase I, RNase-frei zufügen.
4. 20 min bei 30 °C inkubieren.

A.1.13.3 cDNA-Synthese

Erst-Strang-Synthese

1. 18 μ L RNA-Lösung vorlegen.
2. 3 μ L H_2O zufügen.
3. 5 min bei 65°C inkubieren.
4. 8 μ L 5-fach-Puffer
5. 6 μ L H_2O zufügen.
6. 4 μ L dNTP zufügen.
7. 1 min auf Eis legen.
8. 1 μ L reverse Transkriptase zufügen.
9. 1 h bei 37 °C inkubieren.

A.1.13.4 Agarosegel

1. 1 g Agarose vorlegen.
2. 80 mL TAE-Puffer zufügen.
3. 1 min bei 800 W in der Mikrowelle erhitzen.
4. Abkühlen lassen auf 45°C.
5. 5 μ L Ethidiumbromid-Lösung zufügen.
6. 45 min bei 100 V laufen lassen.

A.2 Medien

YPD Medium

Hefeextrakt (Gibco)	10 g
Peptone (Bacto)	20 g
Glucose (Cerestar)	20 g
VE-Wasser	ad 1 L

Schatzmann Medium

MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Sigma)	0,367 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Sigma)	0,448 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	4,8 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (Merck)	2,03 g
KCL (Fluka)	0,96 g
Vitaminlösung	1 mL
Mineralsalzlösung	1,067 mL
Glucosemonohydrat (Fluka)	33 g/L
Desmophen (Bayer)	0,1 mL (nur Reaktor)
Natriumcitrat (Riedel de Haën)	5,8 g (nur Vorkultur)
VE-Wasser	ad 1 L

Mineralsalzlösung

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	0,9 g
FeCl ₃ x 3 H ₂ O (Riedel de Haën)	1,5 g
MnSO ₄ x H ₂ O (Merck)	0,959 g

CuSO ₄ x 5 H ₂ O (Merck)	0,24 g
VE-Wasser	ad 0,1 L

Vitaminlösung

m-Inosit (Merck)	6,0 g
Ca-Pantothenat	3,0 g
Thiamin*HCl (Fluka)	0,6 g
Pyridoxol*HCl (Sigma)	0,15 g
Biotin (Sigma)	0,003 g
VE-Wasser	ad 0,1 L

DMEM (Dulbeccos Modification of Eagles Medium) (Sigma,Steinheim)

DMEM-Pulver / NaHCO ₃	3,7 g (mit HCl auf pH 7)
Serum neugeborener Kälber (NKS)	100,0 mL
Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin	2 mM
Glutamin	2 mM
VE-Wasser	ad 1 L

LB Medium (Luria-Bertani)

Trypton (Bacto)	10 g
Hefeextrakt (Bacto)	5 g
NaCl (Fluka)	10 g
VE-Wasser	ad 1 L

Euglena Medium

MgCO ₃ (Merck)	0,4 g
CaCO ₃ (Fluka)	0,1 g
Glucosemonohydrat(Fluka)	15 g
Harnstoff (Merck)	0,4 g
L-Glutaminsäure (Merck)	5 g

L-Asparaginsäure (Merck)	2 g
L-Äpfelsäure (Merck)	5 g
Glycin (Merck)	2,5 g
Bernsteinsäure	0,1g
Vitaminlösung	10 mL
Mineralsalzlösung 1	10 mL
Mineralsalzlösung 2	10 mL
VE-Wasser	ad 1 L

Vitaminlösung

Thiamin·HCl (Sigma)	6 mg
Cyanocobalamin (Sigma)	0,5 mg
VE-Wasser	ad 0,1 L

Mineralsalzlösung 1

KH_2PO_4 (Merck)	4 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)	1,4 g
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ Merck	0,21 g
VE-Wasser	ad 0,1 L

Mineralsalzlösung 2

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)	1100 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	180 mg
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck)	580 mg
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Riedel de Haën)	24 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)	77 mg
H_3BO_3 (Riedel de Haën)	29 mg
NaNO_3 (Merck)	74 mg
VE-Wasser	ad 0,1 L

Cg (XII) Medium für die Kultivierung der Coryne-Bakterien

Harnstoff	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
CaCl ₂ -Lsg. (1 %ig)	1 mL
KH ₂ PO ₄	1 g
HK ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
Spurenelementelösung	1 mL
Biotin	0,2 mg
Tetrayclin·HCl	10 mg
Kanamycin·H ₂ SO ₄	5 mg
Desmophen	0,1 mL
VE-Wasser	ad 1 L

Spurenelementelösung

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g
MnSO ₄ x H ₂ O	1,0 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O (Merck)	0,20 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,002 g
VE-Wasser	ad 0,1 L

Medien für Stammhaltung auf Agarschrägen und die Kultivierung von *Acremonium chrysogenum* im Bioreaktor und in Schüttelkolben

M190 Medium

Hefeextrakt	4 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Stärke	15 g
Agar (Bacto)	24 g
Leitungswasser	ad 1 L

CFC 1 Medium

Malzextrakt (Bacto)	23 g
Maltose (Bacto)	39 g
Pepton (Bacto)	10 g
Agar (Bacto)	24 g
Leitungswasser	ad 1 L

CFC 2 Medium

Saccharose (Merck)	36,6 g
Cornsteep Liquor (Bioferma)	34,4 g
Ammoniumacetat (Fluka)	5,6 g
CaCO ₃ (Fluka)	5 g
Sojaöl (Bioferma)	4 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	5 g
Leitungswasser	ad 1 L

CFC 3 Medium

CSA (Bioferma)	30 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	12 g
Harnstoff (Merck)	1,2 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	4,8 g
CaCO ₃ (Fluka)	6 g
Sojaöl (Bioferma)	47 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	5 g
Sojamehl (Bioferma)	24 g
Pharmamedia (Bioferma)	12 g
Dextrin (Bioferma)	35 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	2 g
Leitungswasser	ad 1 L

CFC 5 Medium

Cornsteep Liquor (Bioferma)	50 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	9 g

CaCO ₃ (Fluka)	7 g
Sojaöl (Bioferma)	3 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	4 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	0,05 g
Leitungswasser	ad 1 L

Vegetativ-1 Medium

Cornsteep Liquor (Bioferma)	50 g
Ammoniumacetat (Fluka)	10 g
CaCO ₃ (Fluka)	10 g
Sojaöl (Bioferma)	18 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	5 g
Sojamehl (Bioferma)	5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	0,3 g
Desmophen (Bayer)	0,1 mL
Leitungswasser	ad 1 L

Vegetativ-2 Medium

Cornsteep Liquor (Bioferma)	50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	10 g
CaCO ₃ (Fluka)	10 g
Sojaöl (Bioferma)	18 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	5 g
Sojamehl (Bioferma)	5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	0,3 g
Desmophen (Bayer)	0,5 mL
Leitungswasser	ad 1 L

Produktions-Medium

Cornsteep Liquor (Bioferma)	95 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	14 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	8 g
Pharmamedia (Bioferma)	17,5 g
Spurenelementelösung 1000 fach (Bioferma)	1 mL

Sojaöl (Bioferma)	14 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	5 g
Sojamehl (Bioferma)	34 g
Harnstoff (Merck)	3 g
KH_2PO_4 (Merck)	3 g
Stärke (Bioferma)	20 g
Dextrin (Bioferma)	65 g
Desmophen (Bayer)	0,5 mL
Leitungswasser	ad 1 L

A.3 Puffer und Lösungen

EBSS-Puffer

NaCl (Fluka)	8,2 g
KCl (Fluka)	0,41 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)	0,27 g
Glucosemonohydrat (Cerestar)	1 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)	1,25 g
HEPES	6,5 g
VE-Wasser	ad 1 L

BCECF-AM-Arbeitslösung (1 mM) 0,63 mg

BCECF-AM (Molecular Probes)	0,63 mg
DMSO	ad 1 mL

Kalibrationspuffer

pH 5

Essigsäure (Applichem)	0,6 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Salzsäure	zum Einstellen des pH-Werts

pH 5,5

Essigsäure (Applichem)	0,6 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Salzsäure	zum Einstellen des pH-Werts

pH 6

2-Morpholino-ethansulfonsäure (Sigma)	1,95 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Salzsäure	zum Einstellen des pH-Werts

pH 6,5

2-Morpholino-ethansulfonsäure (Sigma)	1,95 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Natronlauge	zum Einstellen des pH-Werts

pH 7

K ₂ HPO ₄ (Merck)	1,74 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Salzsäure	zum Einstellen des pH-Werts

pH 7,5

K ₂ HPO ₄ (Merck)	1,74 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Natronlauge	zum Einstellen des pH-Werts

pH 8

TRIS (Sigma)	1,21 g
VE-Wasser	ad 0,1 L
Salzsäure	zum Einstellen des pH-Werts

Lösungen für die Messungen mit der Sulfitmethode

Na ₂ SO ₃ (Fluka)	5 g bzw. 10 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	2,5 g
VE-Wasser	ad 1 L
Katalysatorlösung	0,1 % zum Reaktionsstart

Katalysatorlösung

Co ₂ SO ₄ (Fluka)	1,5 g
VE-Wasser	ad 1 L

CPC-HPLC

Na ₂ HPO ₄	14 mM
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	10,3 mM
Reinstwasser	1,5 L
Natronlauge (0,1 M)	zum Einstellen des pH-Werts
Methanol	42 mL
Reinstwasser	ad 2 L
pH-Wert	6,5

Aminosäure HPLC Eluent A:

Natriumacetat (Fluka)	13,6 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	12 g
Natriumacetat (Fluka)	12 g
Reinstwasser	1,5 L
Natronlauge (0,1 M)	zum Einstellen des pH-Werts
Tetrahydrofuran (Riedel de Haën)	42 mL
Methanol (Riedel de Haën)	42 mL
Reinstwasser	ad 2 L

Aminosäure HPLC Eluent B:

Methanol (Riedel de Haën)	1080 mL
VE-Wasser	920 mL

A.4 Kolben

Füllvolumen	50 mL			100 mL			200 mL		
Kolbennennvolumen [mL]	300	500	1000	300	500	1000	300	500	1000
Pegel (in Ruhe, [mm])	10	4	5	21	13	5	45	26	19
Pegel (60 rpm, [mm])	20	15	21	25	25	20	45	30	25
Pegel (120 rpm, [mm])	26	29	28	35	37	33	58	45	42
Pegel (240 rpm, [mm])	47	53	52	68	66	65	84	85	83

Tab. A.1: Übersicht über die Flüssigkeitsstände an den Kolbenwänden, die sich bei der angegebenen Drehzahl, dem angegebenen Füllvolumen und 2,5 cm Schüttelhub im den Kolben einstellen.

Füllvolumen	50 mL			100 mL			200 mL		
Kolbennennvolumen [mL]	300	500	1000	300	500	1000	300	500	1000
Pegel (in Ruhe, [mm])	10	4	5	21	13	5	45	26	19
Pegel (60 rpm, [mm])	20	15	22	25	25	21	45	32	25
Pegel (120 rpm, [mm])	27	33	32	38	38	40	59	50	50
Pegel (240 rpm, [mm])	52	57	53	75	72	70	98	95	90

Tab. A.2: Übersicht über die Flüssigkeitsstände an den Kolbenwänden, die sich bei der angegebenen Drehzahl, dem angegebenen Füllvolumen und 5 cm Schüttelhub im den Kolben einstellen.

Füllvolumen	50 mL	100 mL	200 mL
Kolbennennvolumen 300 [mL]	329 mL	279 mL	179 mL
Kolbennennvolumen 500 [mL]	567 mL	517 mL	417 mL
Kolbennennvolumen 1000 [mL]	1081 mL	1031 mL	931 mL

Tab. A.3: Übersicht über die Gasvolumina in den Kolben, die sich aus den eingesetzten Flüssigkeitsvolumina ergeben.

A.5 Geräteliste

Bioreaktor (Hersteller)	Arbeitsvolumen	Max. Rührerdrehzahl	Max. Begasung
Biostat B (Sartorius)	2 L	1200 rpm	5 L
Biostat C (Sartorius)	10 L	1500 rpm	30 L
Biostat UD (Sartorius)	30 L	800 rpm	30 L

Tab. A.4: Übersicht über die verwendeten Bioreaktoren mit Angabe der wichtigsten technischen Daten

Reaktorzubehör

Abluftanalytik	URAS 14 und Magnos	ABB
Sauerstoffelektrode	Inpro 6800 - Serie	Mettler-Toledo
pH-Elektrode	Polyclave - Serie	Hamilton
Sauerstoffmessgerät	Fibox 3	Presens
Sauerstoffmessgerät	Oxy 4	Presens
Waagen	Industrieserie	Sartorius
Mass-Flow-Controller	Diverse	Brooker

Weitere für die Kultivierungen verwendete Messsysteme

Sauerstoffelektrode	Inpro 6800 - Serie	Mettler-Toledo
pH-Elektrode	Polyclave - Serie	Hamilton
Sauerstoffmessgerät	Fibox 3	Presens
Sauerstoffmessgerät	Oxy 4	Presens
Reflektometer	Reflectoquant	VWR
Mikroskop	BX41	Olympus
Insitu-Mikroskop	Prototyp	TCI
Glucosemessgerät	YSI 2700 select	Yellow Springs Instruments

Photometer

Multiskan	Thermo
Gene Quant	
Uvicon 940	Kontron
F 4500	Hitachi
BioView	Delta Denish Light, Electric and Acustics

Zentrifugen und Mixer

Megafuge	Haerus
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Centrifuge 5415	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Mixer VM-300	Neo-Lab

Sonstige Geräte

Kugelmühle f. Zellaufschluss	Fastprep FP 120	Thermo Savant
Thermocycler	Thermalcycler Px2	Thermo Electron Corporation
Pipette	Research-Serie	Eppendorf
Autoklav	V150	Systec
Autoklav	Autoclavi SPA	Fedegari

Verbrauchsmaterial

Mikroreaktionsgefäße	2,5 mL und 1,5 mL	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	15 mL und 50 mL	Sarstedt
Pipettenspitzen	diverse	Sarstedt
Sauerstoffmessgerät	Oxy 4	Presens
Reflektometrie Teststreifen	Reflectoquant	VWR

A.6 Abkürzungsverzeichnis

Zentrifugen und Mixer

A	Fläche
7-ACA	7-Aminocephalosporansäure
AM	Acetoxymethylester
BCECF	2',7'-bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)- Carboxyfluorescein
CPC	Cephalosporin C
c	Konzentration
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
D	Durchmesser
D_i	Diffusionskonstante der Komponente i
Ex	Exzitationswellenlänge
Em	Emissionswellenlänge
j_m	Stoffstromdichte von m
F_{Flieh}	Fliehkraft
FAD	Flavinadenindinucleotid
g	Erdbeschleunigung
G	Stoffstrom
h	Stunde

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
k_H	Henrykonstante
$k_L F$ – Wert	Stoffübergangskoeffizient
$k_L a$ – Wert	volumenbezogener Stofftransportkoeffizient
k_R	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
L	Länge
L	Liter
m	Masse
m	Meter
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
$n_{\text{Überflutung}}$	Kritische Drehzahl
nm	Nanometer
p	Partialdruck
Pa	Pascal
PC	Polycarbonat
PC	Personal Computer
PCR	Polmerase Chain Reaktion
PE	Polyethylen
pen N	Penicillin N
PMP	Polymethylpentan
PMV	Patched-Mycel-Volumen
pO ₂ -Wert	Gelöstsauerstoffgehalt
r	Schüttelhub
RISP	Realtime integrated software platform
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
t	Zeit
u	Vektorfeld der Geschwindigkeit
UV	Ultraviolett
\dot{V}	Volumenstrom
V_{aq}	Flüssigkeitsvolumen

V_{mol, O_2}	Molvolumen des Sauerstoffs
VE	Voll entsalzt
V_g	Gasvolumen
VHb	<i>Vitreoscilla</i> -Hämoglobin
v.l.n.r.	von links nach rechts
vvm	Standardliter Gas je Minute und Liter Flüssigkeitsvolumen
W	Watt
Z_{Umlauf}	Zeitbedarf für einen Umlauf
δ_i	Dicke der Grenzschicht i
Δ	Änderung
η_{Luft}	Viskosität der Luft
μm	Mikrometer
μL	Mikroliter
$[SO_3^{2-}]$	Konzentration von Sulfit
$[O_2]_g$	Konzentration von Sauerstoff in der Gasphase
$[O_2]_{g,0}$	Konzentration von Sauerstoff in der Luft
$[O_2]_{aq}$	Konzentration von Sauerstoff in Lösung
x^*	x an der Phasengrenze
τ	Zeitkonstante des Systems
∇	Nabla-Operator

Literaturverzeichnis

- [1] ABRAHAM EP, Newton G.: The Structure of Cephalosporin C. In: *Biochem J* 79 (1961), S. 377–393
- [2] ALT, V.: *Untersuchungen zur reproduzierbaren Darstellung von Cephalosporin C in Schüttelkulturen*, Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Diplomarbeit, 2002
- [3] AUTORENKOLLEKTIV ; SCHUEGERL, K. (Hrsg.): *Analytische Methoden in der Biotechnologie*. Vieweg, 1989
- [4] BAEHR, Stephan K.: *Wärme und Stoffübertragung*. Springer-Verlag, 1994
- [5] BAINBRIDGE, Scott R.I. Perry D.: Oxygen utilisation by isopenicillin N synthase from *Penicillium chrysogenum*. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (1992), Nr. 55, S. 233–238
- [6] BERG, Tymoczko John L. Stryer L.: *Biochemie*. Bd. 5. Ausgabe. Spektrum Verlag, 2003
- [7] BEYER, M: *Untersuchung des Engpasses der Cephalosporin C-Biosynthese in Hochleistungsstämmen von Acremonium chrysogenum*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 1996
- [8] BRÜCKERHOF, T: *Laufende Dissertation*, Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Diss., 2006
- [9] BÜRING, M.: *Kultivierung von Corynebacterium glutamicum zur Untersuchung auf industrielle Verwendbarkeit in der fermentativen Gewinnung von Serin*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 2005
- [10] BROTZU, G.: *Ricerca sudi un nuovo antibiotico*. Lavori dell'isto Digiene di Cagliari, 1948
- [11] BURZLAFF, A.: *Studien zur Wirkungsweise von Ratjadon auf humane Zellen*, Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Diplomarbeit, 2000
- [12] CAREY, Sundberg R.: *Organische Chemie*. 1. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim, 1995
- [13] CRAMM, Siddiqui R. A. Friedrich B.: Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemoprotein of *Alcaligenes eutrophus*. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1994)
- [14] DE MODENA, Gutierrez S. Velasco J. Fernandez F.J. Fachini R. A. Galazzo J. L. Hughes D. E. ; MARTIN, J. F.: The Production of Cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is Improved by the intracellular Expression of a Bacterial Hemoglobin. In: *Bio/Technology* (1993), Nr. 11, S. 926–929

- [15] DIKSHIT, Dikshit K. L. Liu Y. Webster D. A.: The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 293 (1992), S. 241245
- [16] DIKSHIT, Spaulding D. Braun A. Webster D. A.: Oxygen inhibition of globin gene transcription and bacterial haemoglobin synthesis in *Vitreoscilla*. In: *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989), S. 2601–2609
- [17] DIVERSE. *MD-Bio inc.* Internetquelle
- [18] DIVERSE. *Roempp Lexikon Online.* Internetquelle
- [19] ENGEL, M.: *Analyse von Umwelttoxinen auf die globale Genexpression in Escherichia coli*, Universität Hannover, Diplomarbeit, Januar 2005
- [20] HARBECK, Christian: *Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in der Nahrungsmittelindustrie bei der Aufarbeitung landwirtschaftlicher Rohstoffe*, Universität Hannover, Diss., 2003
- [21] HOEK, D.G.; Jahns H. d.: *Algen*. 3. Ausgabe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993
- [22] JAKUBITH, M: *Chemische Verfahrenstechnik*. VCH-Verlagsgesellschaft, 1991
- [23] KALLIO, Kim. D. J. Tsai P. S. ; BAILEY, J. E.: . In: *Eur. J. Biochem.* (1994), Nr. 219, S. 201–208
- [24] KLOCKOW, C.: *Laufende Dissertation*, Universität Hannover, Diss., 2006
- [25] KOEHLER G, Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* (1975), Nr. 256, S. 495–497
- [26] KOIZUMI, Sakagami H. Utsumi A. Fujinaga S. Takeda M. Asano K. Sugawara I. Ichikawa S. Kondo H. Mori S. et a.: Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. In: *Antiviral Res* 21 (1993), Nr. 1
- [27] LUKAS, L.: *The biosynthesis of cephalosporin C by a sulfate-dependent mutant of Cephalosporium acremonium*, Universität Hannover, Diss., 1993
- [28] MAIER, U.: *Gas/Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben*, TH Aachen, Diss., 2002
- [29] MAIER U., Buechs J.: Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. In: *Biochemical Engineering* 7 (2001), Nr. 2
- [30] MAROSE, S: *Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie*, Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Diss., 1999

- [31] MARTIN, Liras P.: Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. In: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 39 (1989), S. 153–187
- [32] ORII, Y. ; WEBSTER, D. A.: Photodissociation of oxygenated cytochrome o(s) *Vitreoscilla* and kinetic studies of reassociation. In: *J. Biol. Chem.* (1986), Nr. 261, S. 35443547
- [33] PARK, Kim K. Howard A. Stark B. Webster D.: *Vitreoscilla* Hemoglobin Binds to Subunit I of Cytochrome by Ubiquinol Oxidases. In: *J. Biol. Chem.* 227 (2002), Nr. 36, S. 33334–33337
- [34] RAMANDEEP, K. Raje M. Kim K. Stark B. Dikshit K. Webster D.: *Vitreoscilla* Hemoglobine: Intracellular localization and binding to membranes. In: *J. Biol. Chem* 276 (2001), Nr. 27, S. 24781–24789
- [35] RAMANDEEP KAUR, Vishwamitra Sharma Shekhar C. Mande Kanak L. D.: Chimeric *Vitreoscilla* Hemoglobine (VHb) Carrying a Flavoreductase Domain Relieves Nitrosative Stress in *Escherichia coli*: New Insight into the Functional Role of VHb. In: *Appl. and Env. Microbiology* 68 (2002), Nr. No. 1
- [36] RIEDEL, E.: *Anorganische Chemie*. 3. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, 1994
- [37] RYLL, J.: *Fermentative Gewinnung von Paramylon aus Euglena gracilis auf Nebenprodukten der Stärkeindustrie in einer Pilotanlage*, Universität Hannover, Diss., 2005
- [38] SAUER, Lasko D. R. Fiaux J. Hochuli M. Glaser R. Szyperski T. Wutherich K. Bailey J. E.: Metabolic Flux Ratio Analysis of Genetic and Environmental Modulations of *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism. In: *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* Vol. 181 (1999), Nov., Nr. No. 21, S. 66796688
- [39] SCHEIDEGGER, Kueenzi M.T. Nueesch J.: Partial purification and catalytic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of β -lactams in *Cephalosporium acremonium*. In: *J. Antibiot.* (1984), Nr. 37, S. 522–531
- [40] SCHÜGERL, K: *Bioreaktionstechnik Band 2, Bioreaktoren und ihre Charakterisierung*. Verlag Salle und Sauerländer, 1991
- [41] SCHIEFELBEIN, D.: *Optimierung der Kultivierung der Hybridomzelllinie BA-D5 zur IgG2b Produktion*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 2005
- [42] SCHIEK, U.: *Identifizierung und Regulation des Flavohämoglobins hmpA von Pseudomonas stutzeri: Funktionelle Aspekte nitrosativen Stresses*, Universität Stuttgart, Diss., 2003

- [43] SCHIMROSCZYK, U. *Durchführung und Beobachtung einer Kultivierung eines genetisch modifizierten Stammes von Acremonium chrysogenum in einem Umwurfreaktor mit besonderer Betrachtung des intrazellulären Sauerstofftransports*. Schwerpunktarbeit. 2004
- [44] SEIDEL, G.: *Kultivierungen mit einem Hochleistungsstamm von Acremonium chrysogenum in komplexen und synthetischen Medien - Strategien zur Produktivitätssteigerung unter Berücksichtigung der Enzymaktivitäten der Cephalosporin C-Biosynthese* -, Universität Hannover, Diss., 1999
- [45] STARK, Y: *Einsatz von Kollagenmatrices im Tissue engineering*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 2004
- [46] STORHAS, W: *Bioreaktoren und Periphere Einrichtungen*. 1. Ausgabe. Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft, 1994
- [47] STROPPE, P.; Langer H. ; STROPPE, H. (Hrsg.): *Physik für Studenten der Natur und Technikwissenschaften*. 10. Ausgabe. Fachbuchverlag Leipzig GmbH, 1984
- [48] TARRICONE, Galizzi A. Coda A. Ascenzi P. Bolognesi M.: Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from Vitreoscilla. In: *Structure* 5 (1997), S. 497–507
- [49] TOLLNICK, K: *Kultivierung von Acremonium chrysogenum in Forschung und Produktion - Medienstrategien zur Auffindung von Engpässen in der Biosynthese des Antibiotikums Cephalosporin C* -, Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Diss., 1996
- [50] VASUDEVAN, Armarego W. L. Shaw D. C. Lilley P. E. Dixon N. E. Poole R. K.: Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a haemoglobin-like protein in Escherichia coli K-12. In: *Mol. Gen. Genet.* 226 (1991)
- [51] WAKABAYASHI, Matsubara H. Webster D. A.: Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla. In: *Nature* 322 (1986)
- [52] WEBSTER, D. A.: Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins,. In: *Adv. Inorg. Biochem.* 7 (1987), S. 245–265
- [53] WEDLER, G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 3. Ausgabe. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 1987
- [54] WETTERARCHIV. <http://www.Wetteronline.de>. Internet
- [55] WITTENBERG, Bergensen F. J. Appleby C. A. Turner G. L.: Facilitated Oxygen Diffusion. In: *J. Biol. Chem.* (1974), Nr. 249, S. 4057–4066

-
- [56] WOLFBEIS: Fluorescence of organic natural products,. In: *Chemical analysis*, Vol. 77 (1985)
- [57] ZHANG, Wolfe S. Demain A.: Effect of ammonium as nitrogen source on production of ACV-synthetase by *Cephalosporium acremonium*. In: *J. Antibiot.* 12 (1987), Nr. 40, S. 1746–1750
- [58] ZHANG, Wolfe S. Demain A.: Phosphate repressible and inhibitable b-lactam synthases in *cephalosporium acremonium* C-10. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1988), Nr. 29, S. 247–247
- [59] ZLOKARNIK, M: *Rührtechnik*. Springer-Verlag, 1999

Lebenslauf

Name:	Oliver Schweder	
Geboren:	18.02.1975 in Hannover	
Familienstand:	Ledig	
Schulischer Werdegang:	16.08.1981 - 17.07.1985 Grundschule Dedensen 29.08.1985 - 24.06.1987 Orientierungsstufe Seelze 05.08.1987 – 08.06.1991 Realschule Seelze 01.08.1991 - 01.07.1994 Georg Büchner Gymnasium Letter	
Wehrdienst:	Ehrenamtlicher Mitarbeiter im Katastrophenschutz gem. KatSG vom 01.08.1993 bis 01.08.2000	
Beginn des Studiums:	10.10.1994 im Fachbereich Chemie der Universität Hannover	
Beginn der Diplomarbeit:	02.04.2001 bei Prof. Dr. Scheper am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover	
Thema der Diplomarbeit:	Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Analytik von Hefezellkulturen	
Abschluss:	Diplom Chemiker am 01.11.2001 mit der Note „gut“	
Beginn der Promotion:	01.12.2001 bei Prof. Dr. Scheper am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover; Themengebiete: Kultivierung von Mikroorganismen Optische Sauerstoffmessung in Zellkulturen	

Abb. A.3: Lebenslauf